



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**

---

**Διδακτορική Διατριβή**

**" ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ "**

της

**ΜΑΡΙΑΣ Λ. ΚΑΡΑΠΕΤΣΑ**

Ιατρού-Επιμελήτριας Β' ΜΕΘ

Υποβλήθηκε για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

© 2015 Μαρία Καραπέτσα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)**

**Δρ. Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**  
*Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας*

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Μακαρίτσης Κωνσταντίνος**  
*Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας*

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Δημήτριος Κουρέτας**  
*Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη**  
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ζωή Δανιήλ**  
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Δημοσθένης Μακρής**  
*Επίκουρος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε και ολοκληρώθηκε στην Κλινική Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το εργαστήριο της Πνευμονολογικής Κλινικής του ΠΝΛ. Η ενασχόληση με το αντικείμενό της μου έδωσε την ευκαιρία να μελετήσω ένα αντικείμενο το οποίο σχετίζεται άμεσα αλλά είναι ελάχιστα γνωστό στην κλινική πρακτική και να έρθω σε επαφή με ανθρώπους που χωρίς αυτή, δεν θα είχα συναντήσει ποτέ.

Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλλαν με την γνώση, τις συμβουλές, την καλή διάθεση, την εργασία και τις ενέργειές τους στην πραγματοποίησή της.

Τον καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Δημήτριο Κουρέτα για την άμεση υποστήριξη και την ουσιαστική ώθηση της προσπάθειάς μου.

Τον λέκτορα του ίδιου τμήματος Δημήτριο Στάγκο και τους συνεργάτες του στο εργαστήριο για την καλή συνεργασία και την επιτυχή διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής.

Τον συνάδελφο πνευμονολόγο Κ.Κωστίκα για την γνώση που μου παρείχε και τον προσωπικό χρόνο που διέθεσε σε ιδιαίτερη χρονική στιγμή.

Την Ε.Τσιλιώνη, βιοχημικό του εργαστηρίου της Πνευμονολογικής Κλινικής με την διεύθυνση και την άδεια του καθηγητή Κ. Γουργουλιάνη, για τις συμπληρωματικές μετρήσεις που διεκπεραίωσε.

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Σπυρίδωνα Ποταμιάνο και Κωνσταντίνο Μακαρίτση αναπληρωτή καθηγητή Γαστρεντερολογίας και μόνιμο επίκουρο καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αντίστοιχα, για τις υποδείξεις τους.

Τέλος, τον καθηγητή, επιβλέποντα της διατριβής, διευθυντή μου στην μονάδα και δάσκαλό μου στην εντατική, Επαμεινώνδα Ζακυνθινό. Του οφείλω την ιδέα της διατριβής, την εξασφάλιση των απαραίτητων προϋποθέσεων για την ολοκλήρωση και την επίβλεψή της. Πιο πολύ όμως τον ευχαριστώ για όσα μου έμαθε και συνεχίζει να μου μαθαίνει, τις περισσότερες φορές χωρίς να μου τα διδάσκει αλλά μέσα από το παράδειγμά του, στην καθημερινή πράξη. Τον ευχαριστώ για την συνεχή υποστήριξη και την ελευθερία που μου δίνει. Εύχομαι η συνεργασία μας να συνεχιστεί απρόσκοπτα στο χρόνο.

Μαρία Καραπέτσα

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: ΜΑΡΙΑ  
Επώνυμο: ΚΑΡΑΠΕΤΣΑ  
Δ/ση κατοικίας:  
Τηλ :  
e-mail : [mkarapetsa@gmail.com](mailto:mkarapetsa@gmail.com)

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Πτυχίο Ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών μετά από πανελλαδικές εξετάσεις με βαθμό πτυχίου «λίαν καλώς»
- Τίτλος ειδικότητας στην Παθολογία
- Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης(MSc) στη Διοίκηση Μονάδων Υγείας
- Πιστοποίηση ως εκπαιδευτής για το σεμινάριο “ Basic Assessment & Support in Intensive Care (BASIC) Course for instructors” της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Εντατικής Θεραπείας (ESICM).

### ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ : 4 ξενόγλωσσες, 2 ελληνικές, 1 συμμετοχή σε πολυκεντρική μελέτη.

ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΒΙΒΛΙΟΥ: Συγγραφή κεφαλαίου «Παθοφυσιολογία Πνευμονικού Οιδήματος» στον τόμο 14 του 2011 της σειράς «Εντατική Θεραπεία & Επείγουσα Ιατρική» του Γ.Ι.Μπαλτόπουλου.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ ΑΡΘΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: (4)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ: ξενόγλωσσες (7), ελληνικές (20)

### ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Κύριος ερευνητής στο ερευνητικό πρόγραμμα «Το οξειδωτικό στρες σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις» της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στη μητέρα μου Δωροθέα,

Της οφείλω τα πάντα.

Η δύναμη και το παράδειγμά της

είναι οδηγός μου τώρα που έχει φύγει.

## **"ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ"**

Διδακτορική Διατριβή

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΡΑΠΕΤΣΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων)
2. **Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Κωνσταντίνος Μακαρίτσης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών που υπερβαίνει τους αντιρροπιστικούς μηχανισμούς καλείται οξειδωτικό στρες. Η παρουσία του έχει διαπιστωθεί σε φυσιολογικές συνθήκες και σε παθολογικές καταστάσεις και αποτελεί σημαντικό δομικό παράγοντα της φλεγμονώδους διαδικασίας. Η παρουσία και κυρίως οι μεταβολές του στη σήψη είναι φαινόμενο που δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η σκοπιμότητα της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει την διακύμανση του οξειδωτικού στρες στους σηπτικούς ασθενείς της εντατικής θεραπείας. Για το λόγο αυτό διενεργήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών βιοδεικτών, οκτώ συνολικά, σε δεκαεπτά διαγνωσθέντες με σηπτική καταπληξία. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαμορφώθηκαν δύο ομάδες προς σύγκριση, οι επιζώντες από το σηπτικό επεισόδιο και οι αποβιώσαντες εξαιτίας του. Από τα ευρήματα διαπιστώθηκαν σημαντικά μειωμένοι οι αντιοξειδωτικοί δείκτες ανηγμένη γλουταθειόνη και καταλάση των ερυθρών και σημαντικά αυξημένη η σουπεροξειδική δισμουτάση του πλάσματος στη διάρκεια της σήψης για την ομάδα των αποβιωσάντων ενώ από τους οξειδωτικούς τα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκαν επίσης αυξημένα για την ίδια ομάδα. Η συνεισφορά της παρούσας μελέτης συνίσταται στην ανάδειξη της ύπαρξης ενός μεγαλύτερου αντιοξειδωτικού ελλείμματος στην πορεία του χρόνου σε όσους κατέληξαν συγκριτικά με αυτούς που επιβίωσαν.

## **ABSTRACT**

The excess production of reactive oxygen species that overcomes the antioxidant defences is termed oxidative stress. It is present in normal state and pathological conditions and holds a functional role in the systemic inflammatory response. Oxidative stress alterations during sepsis have not been clarified in the current literature so far. The scope of the present study was to investigate oxidative stress fluctuations in intensive care septic patients. Repeated measurements of eight oxidant and antioxidant biomarkers were performed during sepsis in seventeen participants with the diagnosis of septic shock. They were divided in two groups, survivors and non-survivors. The results revealed that the antioxidant biomarkers of the erythrocytes reduced glutathione and catalase were decreased while superoxide dismutase in plasma and protein oxidation were increased in the group of the non-survivors. Briefly, the major finding is the presence of a greater antioxidant deficit during sepsis in the non-survivors group in contrast to survivors who retained their antioxidant levels, and this consists the scientific contribution of the study.

## Περιεχόμενα:

### I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Κεφ. 1. Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

1.1. Ελεύθερες ρίζες.....σελ.	16
1.1.1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ή ROS.....	17
1.2. Βιολογική σημασία –Παραγωγή ελεύθερων ριζών.....	19
1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.....	20
i. Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	20
ii. Το σύστημα των NADPH οξειδασών.....	22
iii. Υπεροξειδιοσώματα.....	23
iv. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450.....	23
v. Το ενδοπλασματικό δίκτυο.....	24
vi. Δράση ενζύμων.....	24
vii. Αυτοοξείδωση βιομορίων.....	25
1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.....	25
1.3. Βιολογικές δράσεις των ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	25
1.3.1. Ενδοκυττάρια σηματοδότηση.....	25
1.3.2. Ρύθμιση φυσιολογικών λειτουργιών.....	28
1.3.3. Οξείδωση βιολογικών μακρομορίων.....	29
1.4. Αντιοξειδωτικά.....	32
1.5. Οξειδωτικό στρες-ορισμός.....	34
1.6. Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.....	34

1.7. Οξειδωτικό στρες σε διάφορες παθήσεις.....	40
---	----

## **Κεφ. 2. Σήψη και συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση**

2.1. Ορισμοί-Βαρύτητα σήψης.....	47
2.2. Σήψη: Επίπτωση-έκβαση.....	50

## **Κεφ. 3. Φλεγμονώδης απάντηση και οξειδωτικό στρες-Μηχανισμοί.**

3.1. Η ανοσιακή απάντηση.....	51
3.2. Προέλευση ελεύθερων ριζών στη φλεγμονή.....	53
3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στη φλεγμονή.....	57
3.4. Οξειδωτικό στρες και μετακίνηση φλεγμονωδών κυττάρων.....	60
3.5. Οξειδωτικό στρες και ενδοθήλιο.....	61
3.6. Σηματοδοτικός ρόλος των ελεύθερων ριζών στη φλεγμονή.....	62
3.7. Ελεύθερες ρίζες και ιστική βλάβη.....	64

## **Κεφ. 4. Το οξειδωτικό στρες στη ΜΕΘ**

4.1. Το οξειδωτικό στρες στους βαρέως πάσχοντες.....	65
4.2. Χορήγηση αντιοξειδωτικών.....	67
i. Γλουταμίνη.....	67
ii. Σελήνιο.....	70
iii. Ψευδάργυρος.....	72
iv. Αλβουμίνη.....	73
v. Ν-ακετυλκυστεΐνη.....	74

vi.	Βιταμίνη C.....	74
vii.	Βιταμίνη E.....	76
viii.	Βιταμίνες συμπλέγματος Β.....	77

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφ. 5. Το οξειδωτικό στρες στη σήψη

5.1.	Εισαγωγή.....	80
5.2.	Σκοπός της μελέτης.....	82
5.3.	Πρωτόκολλο της μελέτης.....	83
5.3.1.	Πληθυσμός.....	83
5.3.2.	Σχεδιασμός.....	83
5.3.3.	Κριτήρια επιλογής.....	84
5.3.4.	Κριτήρια αποκλεισμού.....	84
5.3.5.	Διαδικασίες πρωτοκόλλου.....	84
5.3.6.	Ορισμοί.....	87
5.3.7.	Διευκρινίσεις.....	87
5.3.8.	Συλλογή δειγμάτων.....	88
5.4.	Επεξεργασία δειγμάτων και προσδιορισμός βιοδεικτών.....	89
5.5.	Στατιστική ανάλυση.....	97

5.6. Αποτελέσματα.....	98
------------------------	----

## **Κεφ. 6. Συζήτηση-Συμπεράσματα**

6.1. Συζήτηση.....	111
--------------------	-----

6.2. Συμπεράσματα.....	122
------------------------	-----

<b>III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>123</b>
-------------------------------	------------

## **IV. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Κατάλογος Πινάκων.....	150
------------------------	-----

Κατάλογος Γραφημάτων.....	152
---------------------------	-----

Κατάλογος Αντιδράσεων.....	154
----------------------------	-----

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

### 1.1. Ελεύθερες ρίζες

Η ύλη αποτελείται από άτομα και μόρια τα οποία περιέχουν ζεύγη ηλεκτρονίων τοποθετημένα σε στοιβάδες. Κάθε ζεύγος κινείται σε καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται ατομικό ή μοριακό τροχιακό αντίστοιχα. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε μόριο ή άτομο στοιχείου ή χημικής ένωσης που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η δημιουργία της προκαλείται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα [1].

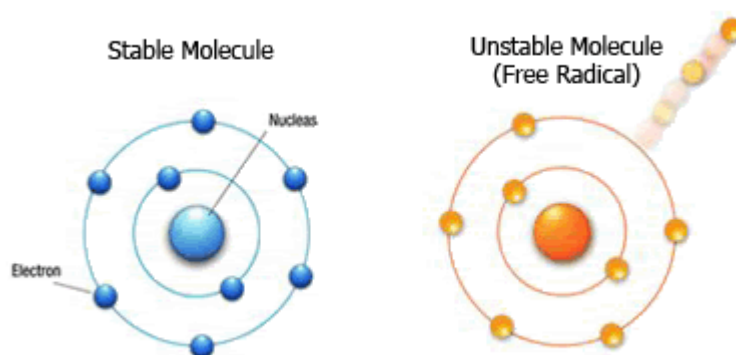
Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Κατά την απεικόνιση, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια παριστάνονται συνήθως με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από τον χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας.

Τα ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους σε αντίθετες κατευθύνσεις (spin). Το γεγονός αυτό προσδίδει σταθερότητα και διατηρεί το άτομο ή μόριο σε χαμηλή ενεργειακή κατάσταση καθιστώντας το λιγότερο δραστικό.

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας μένουν ασύζευκτα περιστρέφονται προς την ίδια κατεύθυνση με αποτέλεσμα το άτομο ή μόριο να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, να εμφανίζει αστάθεια και να έχει μεγαλύτερη τάση να αντιδράσει με άλλα μόρια.

Η έντονη έλξη που ασκεί ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων ή μορίων προκαλεί χημικές αντιδράσεις με επακόλουθο την μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (*redox*). Οξείδωση χαρακτηρίζεται η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο ενώ αναγωγή η προσάρτησή τους σε αυτό.





**Εικόνα 1.** Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

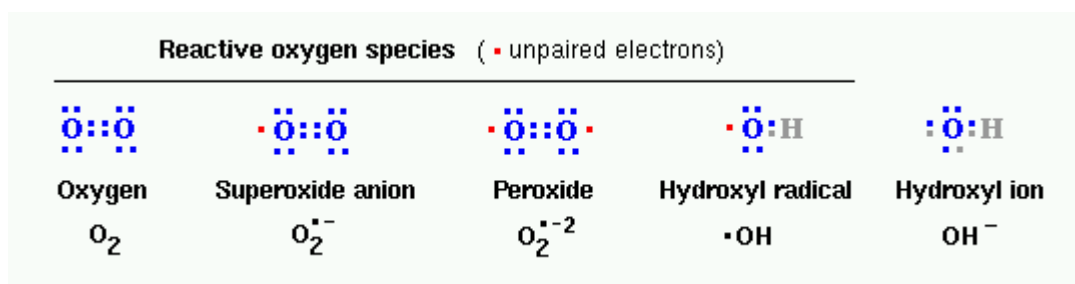
Αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα σχηματιστεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις [2]. Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα δεσμευθούν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα [3].

Στα βιολογικά συστήματα το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μπορεί να προέρχεται από άτομο οξυγόνου, θείου, χλωρίου, άνθρακα ή άτομο αζώτου.

#### **1.1.1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ή ROS (Reactive Oxygen Species ).**

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) ή Reactive Oxygen Species (ROS) αναφέρεται σε ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου.

Το μοριακό οξυγόνο  $O_2$  (dioxygen) έχει μια ιδιαίτερη διαμόρφωση των ηλεκτρονίων και αποτελεί το ίδιο μία ελεύθερη ρίζα [4]. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ή ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), υπεροξειδίου ( $RO_2^{\cdot}$ ), αλκοξειδίου ( $RO^{\cdot}$ ), υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\cdot}$ ). Στις ΔΜΟ επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), το όζον ( $O_3$ ) και το μονήρες οξυγόνο ή singlet oxygen ( $^1O_2$ ) [5]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αντιπροσωπεύουν την πιο σημαντική κατηγορία ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς [4].



**Εικόνα 2.** : Θέση ασύζευκτων ηλεκτρονίων στις Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

Μία αντίστοιχη ομάδα αποτελούν οι Δραστικές Μορφές Αζώτου (ΔΜΑ) ή Reactive Nitrogen Species (RNS) που περιλαμβάνει τις ελεύθερες ρίζες στις οποίες το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι τοποθετημένο σε άτομο αζώτου, όπως το μονοξείδιο ( $NO^{\cdot}$ ) και το διοξείδιο του αζώτου ( $NO_2^{\cdot}$ ), καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες και/ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ  $HNO_2$  και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου  $ONOO^-$ ) [5].

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	
Ρίζες	Μη ρίζες
$O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $RO_2^{\cdot-}$ , $RO^{\cdot}$ , $HO_2^{\cdot}$	$H_2O_2$ , $HOCl$ , $HOBr$ , $O_3$ , $^1O_2$
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)	
Ρίζες	Μη ρίζες
$NO^{\cdot}$ , $NO_2^{\cdot-}$ ,	$HNO_2$ , $NO^+ / NO^-$ , $N_2O_4$ , $N_2O_3$ , $ONOO^-$
$ONOOH$ , $NO_2^+$ , $ROONO$	

**Πίνακας 1:** Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) στον άνθρωπο [5].

Στον οργανισμό παράγονται επίσης Δραστικές Μορφές Χλωρίου (RCS) [5].

Το αντικείμενο ενασχόλησης στο θεωρητικό και στο ερευνητικό πεδίο της παρούσας διατριβής θα εστιαστεί στην μελέτη των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.

## 1.2. Βιολογική σημασία-Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ζωής στη γη όταν, με την μεσολάβηση ελεύθερων ριζών, σχηματίστηκαν τα πρώτα αμινοξέα και νουκλεοτίδια από ανόργανα συστατικά πριν 3.5-4.000.000 χρόνια [6]. Στη συνέχεια η παραγωγή του οξυγόνου ως προϊόν μεταβολισμού των κυανοβακτηρίων και η τοξική του δράση στους αναερόβιους οργανισμούς αποτέλεσε πίεση επιλογής για την ανάπτυξη μηχανισμών εξουδετέρωσης, για την εξέλιξη σε πολυκύτταρες δομές με κύρια πηγή ενέργειας τα μιτοχόνδρια και παράλληλα οδήγησε την ζωή από τα βάθη των ωκεανών στην επιφάνεια της γης [7,8].

Ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς σαν διαδικασία της φυσιολογικής αερόβιας ζωής στον ανθρώπινο οργανισμό προερχόμενες τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές.

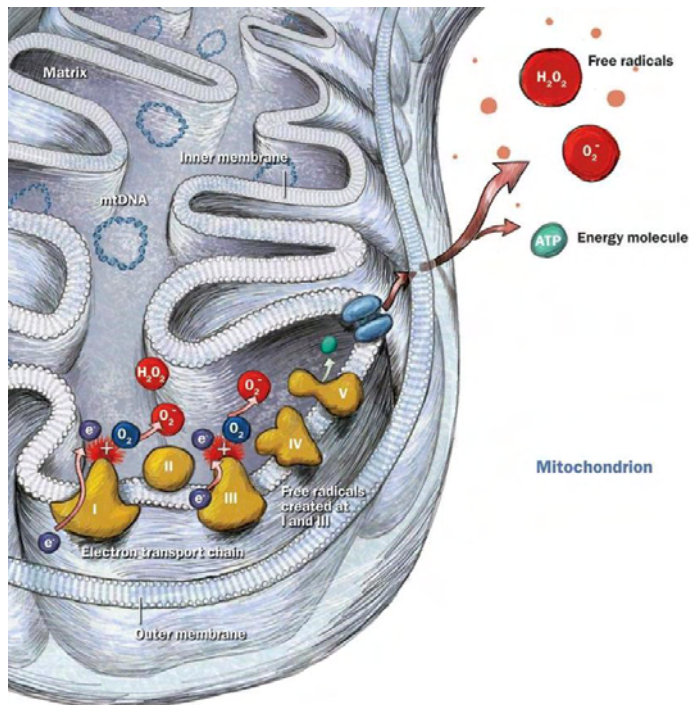
### **1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών**

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα τα οποία χρησιμοποιούν οξυγόνο για την λειτουργία τους. Οι κύριες πηγές παραγωγής ΔΜΟ σε επίπεδο κυττάρου είναι:

**i. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση.** Οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η θεμελιώδης διαδικασία παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο που διεξάγεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ΔΜΟ [9]. Κατά την διάρκειά της, το  $O_2$  ανάγεται σε  $H_2O$  μέσω της οξείδωσης του NADH και της μεταφοράς ηλεκτρονίων διαμέσου των συμπλεγμάτων I-IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Η ενέργεια που εκλύεται καταλήγει στον σχηματισμό ATP.

Εικόνα 3.

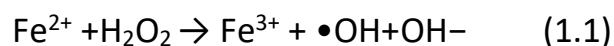
Η παραγωγή ΔΜΟ στα μιτοχόνδρια αποτελεί παραπροϊόν του βασικού κυτταρικού μεταβολισμού. Υπολογίζεται ότι το 1-3% των ηλεκτρονίων που μετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα «διαφεύγουν» και σχηματίζουν σουπεροξειδίο, το οποίο θεωρείται η «πρωταρχική» ελεύθερη ρίζα. Αυτή στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω ενζυμικών ή μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων για να σχηματίσει «δευτερογενείς» ρίζες [10].



Πηγή: Internet

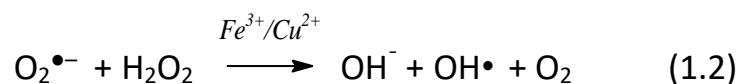
### Εικόνα 3: Παραγωγή ROS στο μιτοχόνδριο

Σε συνθήκες στρες το σουπεροξειδίο δρα οξειδωτικά σε ένζυμα που περιέχουν δεσμούς σιδήρου (4Fe-4S) και απελευθερώνει σίδηρο ( $\text{Fe}^{2+}$ ) διευκολύνοντας την παραγωγή υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton [10-12], (αντίδραση 1.1) :



Το υδροξύλιο  $\bullet\text{OH}$  αποτελεί μια έντονα δραστική ρίζα που αντιδρά με όλα τα βιολογικά μόρια και διαθέτει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής ( $10^{-9} \text{ s}$ ) [13]. Για το λόγο αυτό αντιδρά κοντά στο σημείο σχηματισμού της και έχει μεγάλη φυσιολογική σημασία [14].

Άλλη οδός για την παραγωγή της, είναι η αντίδραση Haber-Weiss [15] (αντίδραση 1.2):



Η αντίδραση Haber-Weiss είναι αρκετά αργή για να έχει φυσιολογική σημασία, αλλά μπορεί να πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα παρουσία μεταβατικών μετάλλων, χηλικών ενώσεων ή αιμοπρωτεϊνών. Στα βιολογικά συστήματα το μεταβατικό μέταλλο είναι συνήθως ο σίδηρος συνδεδεμένος με διάφορες πρωτεΐνες, όπως φεριτίνη, λακτοφερίνη και αιμοσφαιρίνη [16].

**ii. Το σύστημα των NADPH οξειδασών (NOX).** Οι NADPH οξειδάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που αποτελείται μέχρι σήμερα από 7 γνωστά ισόμορφα και είναι κατανεμημένες σε μια ποικιλία ιστών. Πρόκειται για πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε μεμβράνες που πρωταρχικό ρόλο έχουν να καταλύουν την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου μεταφέροντας ηλεκτρόνια και να παράγουν σουπεροξείδιο ως κύριο προϊόν (αντίδραση 1.3):



Με αυτό τον τρόπο συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η αύξηση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση, η ρύθμιση του κυτταροσκελετού, η σύσπαση. Οι διάφορες ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την κατανομή στους ιστούς, την δομή του κύριου τμήματος, τις υπομονάδες και τον τρόπο ενεργοποίησης [17,18].

Η NOX2 ισομορφή, αποτελεί την κύρια φαγοκυτταρική NADPH οξειδάση με βασικό ρόλο την παραγωγή σουπεροξειδίου για την καταστροφή των βακτηρίων. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζεται και σε άλλους ιστούς όπως στα

μυοκαρδιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, στους νευρώνες, στα β-κύτταρα του παγκρέατος.

Η NOX 1 βρίσκεται στο επιθήλιο του κόλου καθώς και σε άλλα επιθήλια, στο ενδοθήλιο, στις λείες μυϊκές ίνες, στους ινοβλάστες και στη μικρογλοία.

Η NOX3 στο έσω ους, η NOX4 στους νεφρούς και σε όλα τα κύτταρα των αγγείων, ινοβλάστες, οστεοκλάστες, νευρώνες και η NOX5 στο λεμφικό ιστό και τους όρχεις.

Στο θυρεοειδή αδένα έχουν ανιχνευθεί οι DUOX1 και DUOX2 (dual oxidase 1 και 2) που παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες και δράση ανάλογη με τις NOX.

Ενεργοποιούνται από το  $\text{Ca}^{2+}$  όπως η NOX5.

Η έκφραση των NADPH οξειδασών ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις [19].

**iii. Υπεροξειδισώματα (Peroxisomes).** Αποτελούν κυτταρικά σωματίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα υπεύθυνα για οξειδωτικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα την β-οξείδωση της μακράς αλυσίδας των λιπαρών οξέων και επομένως συνιστούν ενδογενή πηγή ΔΜΟ, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Όμως τα μικρά αυτά μεμβρανικά κυστίδια εκτός από τις οξειδάσες περιέχουν και καταλάση που αποδομεί το υπεροξείδιο διατηρώντας την οξειδοαναγωγική τους ισορροπία. Όταν καταστραφούν ή μειωθεί το αντιοξειδωτικό τους αποθεματικό, απελευθερώνουν τις ελεύθερες ρίζες στο κυτταρόπλασμα [20,21].

**iv. Το σύστημα του κυτοχρώματος CYP450.** Η δράση των ενζύμων του κυτοχρώματος αποτελεί μία σημαντική πηγή παραγωγής ROS στο κύτταρο. Η πιο κοινή αντίδραση που καταλύεται από το CYP450 είναι μια αντίδραση μονοοξυγενάσης κατά την οποία ένα άτομο  $\text{O}_2$  οξειδώνει το υπόστρωμα (RH) ενώ το

άλλο ανάγεται σε H<sub>2</sub>O μέσω του NADPH σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (αντίδραση 1.4):



Ωστόσο η ολοκληρωμένη διεξαγωγή της παραπάνω αντίδρασης υπολείπεται για τα περισσότερα ένζυμα του κυτοχρώματος και συμβαίνει να καταναλώνεται αναλογικά περισσότερο O<sub>2</sub> σε σύγκριση με το υπόστρωμα με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS [22].

**v. Το ενδοπλασματικό δίκτυο.** Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένας κυτταρικός σχηματισμός απαραίτητος για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών μέσω θειολικών δεσμών. Το γεγονός αυτό απαιτεί την ενεργοποίηση καταλυτών που κατευθύνουν κατάλληλα τις αντιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αλλά ευνοούνται σε ένα σχετικά οξειδωτικό περιβάλλον [23,24].

Έχει εκτιμηθεί πως η παραγωγή του 25% των ΔΜΟ του κυττάρου προέρχεται από τον σχηματισμό δισφουλφιδικών δεσμών κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών [25].

**vi. Δράση ενζύμων.** Πρόκειται για οξειδάσες και οξυγενάσες όπως η λιποξυγενάση, η μυελοπεροξειδάση, οι μονοοξυγενάσες η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου, η ξανθινική οξειδάση που γεννούν ΔΜΟ κατά την εξέλιξη του ενζυματικού τους κύκλου [26].



**vii. Αυτοοξειδωση βιομορίων.** Σε αυτά ανήκουν οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες, το τετραϋδροφολικό και η αιμοσφαιρίνη που μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας σουπεροξειδιο [16,27,28].

### **1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών**

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται διάφοροι, ετερογενείς παράγοντες όπως είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση [29], ο καπνός του τσιγάρου [30], η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία [31,32] αλλά και η άσκηση [33].

Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίξει σημαντικό ρόλο [13,34,35].

### **1.3. Βιολογικές δράσεις των ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό.**

Σήμερα αναγνωρίζεται πως η δράση των ΔΜΟ ασκεί ενεργό ρόλο εκτός από τις παθολογικές καταστάσεις και σε φυσιολογικές συνθήκες [36], όπως φαίνεται παρακάτω:

#### **1.3.1. Κυτταρική επικοινωνία και ενδοκυττάρια σηματοδότηση (cell-signalling)**

Πολλοί τύποι κυττάρων παράγουν ΔΜΟ σε ελεγχόμενες συγκεντρώσεις όταν διεγείρονται από κυτοκίνες, αναπτυξιακούς παράγοντες και ορμόνες όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6, η ιντερλευκίνη-3 (IL-3), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), η αγγειοτενσίνη II (ANGII), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο αυξητικός νευρικός παράγοντας (NGF), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (TGF-1), ο αυξητικός παράγοντας των λευκών και των ινοβλαστών (GM-CSF) (FGF-2) [37].

Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως η έναρξη και η λειτουργία αρκετών ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτώνται από την δράση των ΔΜΟ, που λειτουργούν σε πολλαπλά σημεία του σηματοδοτικού καταρράκτη. Άρα διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό φυσιολογικό ρόλο σαν δευτερογενείς αγγελιοφόροι [38,39]. Η πιο έντονη επίδραση των ΔΜΟ στη σηματοδότηση έχει παρατηρηθεί στις διαδρομές της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK (mitogen-activated protein kinase) [40].

Αυξητικοί παράγοντες όπως ο epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), συνδέονται σε υποδοχείς, που είναι τυροσινικές κινάσες (RTKs). Οι υποδοχείς αυτοί είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά της πληροφορίας από έξω προς το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών των πρωτεϊνικών κινάσων mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [41]. Στα κύτταρα, με εξαίρεση τα φαγοκύτταρα, η σύνδεση του παράγοντα στον υποδοχέα προκαλεί την γένεση ΔΜΟ. Το ίδιο συμβαίνει και με κυτοκίνες όπως ο TNF- $\alpha$ , IL-1 ή ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) που συνδέονται σε κανάλια ιόντων ή G proteins [42]. Οι ΔΜΟ που παράγονται από τις παραπάνω οδούς αποτελούν μεσολαβητές για πολύ σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (programmed cell death).

Άλλες κινάσες, οι κινάσες της οικογένειας Src (Src Kinases) και ανάμεσά τους η Janus κινάση (JAK) ενεργοποιούνται επίσης από τις ΔΜΟ και προκαλούν την έναρξη στα MAPK, NF- $\kappa$ B, and PI3K σηματοδοτικά μονοπάτια [43].

Οι φωσφατάσες της πρωτεϊνικής τυροσίνης είναι άμεσοι στόχοι των ΔΜΟ και η παροδική αδρανοποίησή τους οδηγεί σε μεταβολή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και της σηματοδότησης στο κύτταρο [44].

Η υπερικογενεία TGF-β περιλαμβάνει κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η TGF-β1 διεγείρει την παραγωγή ΔΜΟ σε μια ποικιλία κυττάρων και αναστέλλει την ανάπτυξή τους [45]. Η Akt διεγείρει τη ανάπτυξη και αναστέλλει την απόπτωση. Συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη με την PI3K. Ενεργοποίηση του VEGF από τις ΔΜΟ πραγματοποιείται μέσω της οδού PI3K/Akt. Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του καρκίνου και η ενεργοποίηση της εξαρτάται από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου [46]. Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης των οικογενειών ERKs, οι c-jun-NH2-terminal kinases (JNKs), οι p38 MAPK και οι BMAPK-1 της υπερικογενείας MAPK, επίσης ρυθμίζονται από τις ΔΜΟ και είναι σημαντικές στην καρκινογένεση επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση [47].

Στα μονοπάτια των MAPKs που όπως προαναφέρθηκε μεσολαβούν οι ΔΜΟ περιλαμβάνονται και πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-κB που ενέχεται σε φλεγμονώδεις διαδικασίες, ο AP-1 που είναι σημαντικός για την αύξηση και την διαφοροποίηση, ο p53 που η αδρανοποίησή του συνδέεται με πολλούς καρκίνους καθώς επιτρέπει την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση, ο NFAT που ρυθμίζει το σχηματισμό κυτοκινών, την αύξηση των μυών, την αγγειογένεση και την λιπογένεση, και ο HIF-1 που ελέγχει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τον καρκίνο [40].

### 1.3.2. Ρύθμιση φυσιολογικών λειτουργιών

Σε επίπεδο οργανισμού μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες υπόκεινται στον έλεγχο των ελεύθερων ριζών μέσω οξειδοαναγωγικών μηχανισμών [36,48] και είναι:

- I. Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου μέσω ρύθμισης της έκφρασης των συνθετασών του μονοξειδίου (iNOS) από τους NF-κΒ και MAPKs,
- II. η άμυνα απέναντι στα βακτήρια με την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου για την καταστροφή τους από τις NADPH οξειδάσες των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων και μακροφάγων,
- III. η ρύθμιση ενδοκυττάρων μηχανισμών στα μυοκαρδιακά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά, στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στους ινοβλάστες από ΔΜΟ που παράγονται από τις NAD(P)H οξειδάσες,
- IV. η ενεργοποίηση του cGMP για την ρύθμιση του αγγειακού τόνου και την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων,
- V. η ανίχνευση αλλαγών στη συγκέντρωση του οξυγόνου είτε από πρωτεΐνες που παράγουν ΔΜΟ όπως το β-τύπου κυτόχρωμα, είτε από το ρυθμό παραγωγής ΔΜΟ στα μιτοχόνδρια, είτε από την παραγωγή ορμονών που ρυθμίζονται από τον HIF-1,
- VI. Η ευόδωση της προσκόλλησης κυττάρων όπως των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης,
- VII. Η ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των Τ-λεμφοκυττάρων που ελέγχεται από το οξειδωτικό περιβάλλον.
- VIII. Η απόπτωση .

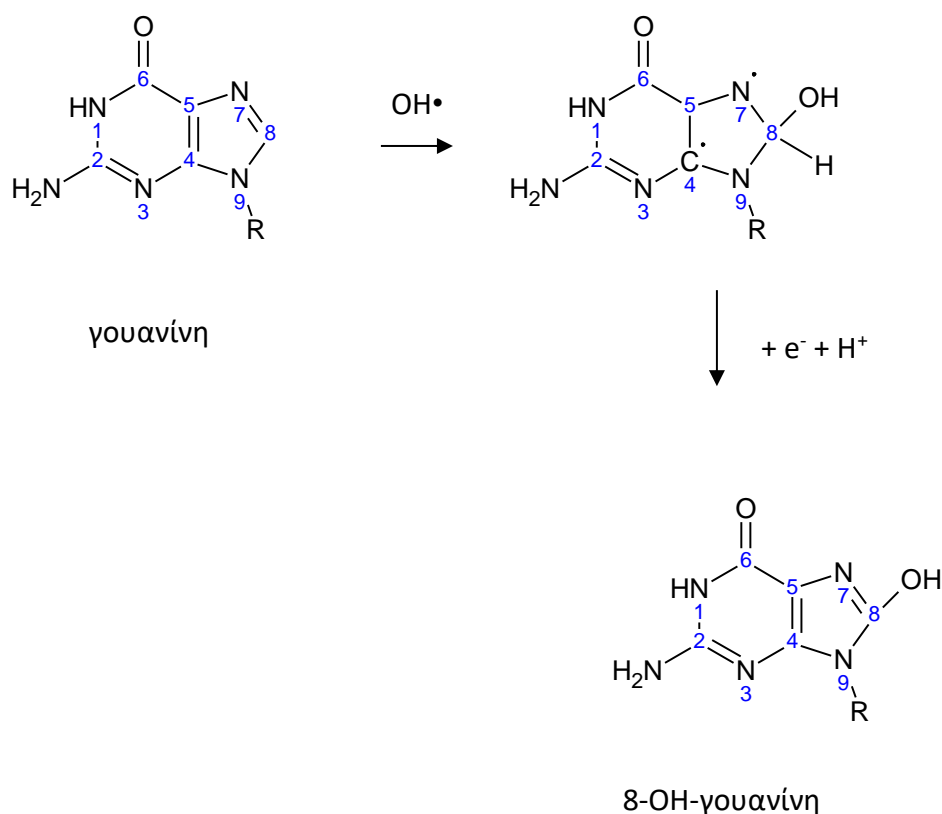
### 1.3.3. Οξείδωση βιολογικών μακρομορίων

Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ΔΜΟ οξειδώνουν καίριες κυτταρικές δομές όπως:

#### DNA

Η ρίζα του  $\text{OH}\cdot$  είναι γνωστό πως αντιδρά με όλα τα τμήματα του μορίου του DNA προσβάλλοντας τόσο τις αζωτούχες βάσεις της πουρίνης και της πυριμιδίνης όσο και τον ιστό της δεοξυριβόζης [13]. Η πιο μελετημένη βλάβη στο DNA είναι ο σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης (8-OH-G).

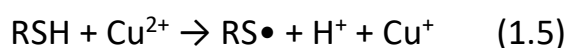
Το  $\text{OH}\cdot$  μπορεί να προστεθεί στη βάση του DNA γουανίνη, στις θέσεις 4, 5 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου. Η προσθήκη  $\text{OH}\cdot$  στη θέση C8 οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυγουανίνης (Σχήμα 1.1), ο προσδιορισμός της οποίας χρησιμοποιείται ως δείκτης για την πρόκληση βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες [49]. Επιπλέον, οι ROS προκαλούν συνήθως στο DNA μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις.



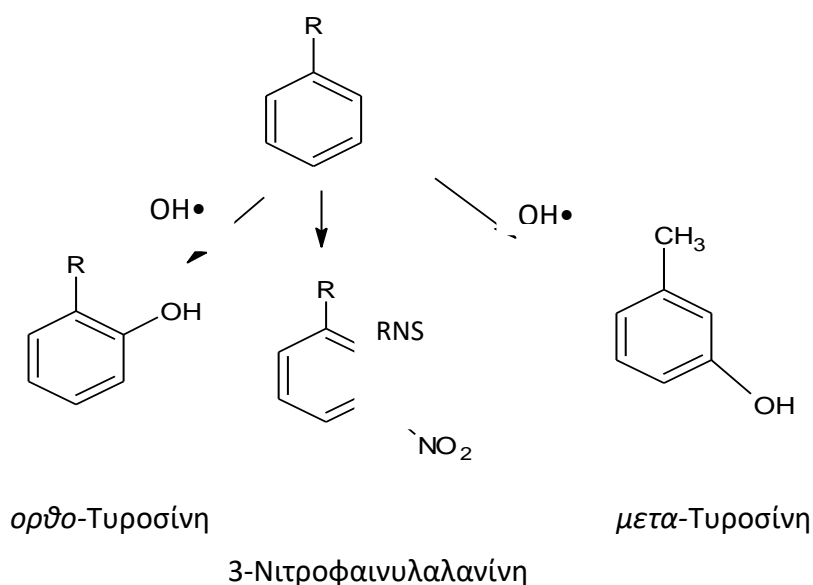
**Σχήμα 1.1.** Σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης. Προσθήκη μιας  $\text{OH}\cdot$  στον C8 της γουανίνης οδηγεί στο σχηματισμό της ρίζας της 8-υδροξυγουανίνης, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε 8-υδροξυγουανίνη.

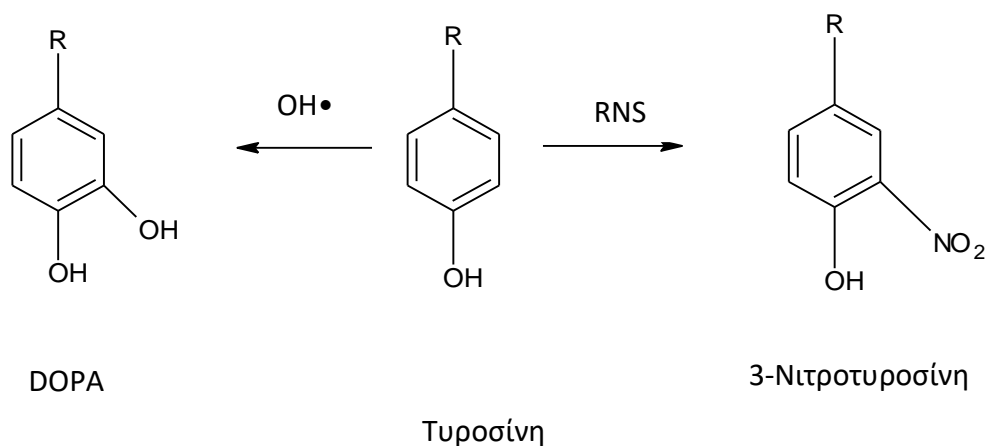
### Πρωτεΐνες

Οι πλευρικές αλυσίδες όλων των αμινοτελικών άκρων των πρωτεϊνών ιδιαίτερα όσων περιέχουν κυστεΐνη και μεθειονίνη είναι ευαίσθητες στην οξείδωση από τις ROS/RNS [50]. Οι σουλφυδρυλικές ( $-\text{SH}$ ) ομάδες της κυστεΐνης οξειδώνονται σε θειολικές ρίζες ( $\text{RS}\cdot$ ) μετά από την προσβολή των ROS/RNS με την συμμετοχή ιόντων μεταβατικών μετάλλων (αντίδραση 1.5).



Με την δράση του  $\text{OH}\cdot$  και των RNS στην τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη παράγονται διάφορα προϊόντα:

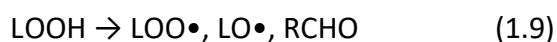
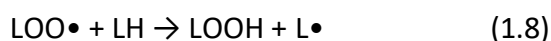




**Σχήμα 1.2.** Προϊόντα που σχηματίζονται μετά από την επίδραση ROS και RNS στα αμινοξέα τυροσίνη και φαινυλαλανίνη. DOPA: Δυδροξυφαινυλαλανίνη.

### Λιπίδια

Θεωρούνται η πιο ευαίσθητη κατηγορία βιολογικών μακρομορίων στην οξειδωτική προσβολή. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης εύκολα υποκύπτουν στην δράση των ROS [51]. Η λιπιδιακή υπεροξείδωση μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες επειδή την αρχική οξείδωση ακολουθεί μια αυτο-αναπαραγόμενη αλυσίδα αντιδράσεων [52,53]. Η λιπιδιακή υπεροξείδωση ξεκινάει με την οξείδωση ενός λιπαρού οξέος (LH) από μια ρίζα ( $R\bullet$ ) με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας λιπιδιακής ρίζας ( $L\bullet$ ) (αντίδραση 1.6). Η λιπιδιακή ρίζα μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) και να σχηματιστεί μια ρίζα περοξυλίου ( $LOO\bullet$ ) (αντίδραση 1.7). Οι ρίζες περοξυλίου προκαλούν μια κυκλική αλυσίδα αντιδράσεων κατά τις οποίες μπορούν να οξειδωθούν περισσότερα μόρια PUFA και να σχηματιστούν λιπιδιακά υπεροξείδια ( $LOOH$ ) (αντίδραση 1.8) που μπορούν να διασπαστούν σε πιο δραστικά μόρια, ιδιαίτερα σε αλδεΐδες ( $RCHO$ ) (αντίδραση 1.9).

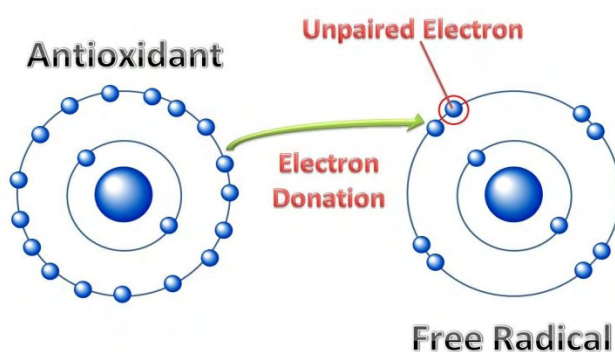


Κύρια προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης είναι η μαλονδυαλδεΰδη (MDA) και η 4-υδροξυ-τρανς-2-νονενάλη (4-HNE).

#### 1.4. Αντιοξειδωτικά

Η έκθεση στις ελεύθερες ρίζες οδήγησε τους οργανισμούς στην ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών. Αυτοί μπορεί να είναι προληπτικοί, επιδιορθωτικοί, να αποτελούν φυσική άμυνα ή να είναι αντιοξειδωτικές ουσίες [54].

Σαν αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοδήποτε συστατικό που όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα, αναστέλλει ή επιβραδύνει σημαντικά την οξείδωση του υποστρώματος [55]. Η δράση των αντιοξειδωτικών εκφράζεται με την παρεμπόδιση της οξείδωσης των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες ή με τον περιορισμό του σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Δηλαδή, τα αντιοξειδωτικά δρουν προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και τις αδρανοποιούν (Εικόνα 4) ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα των οργανισμών.



**Εικόνα 4.** Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικού.



Μετά την αντίδραση, τα αντιοξειδωτικά μετατρέπονται σε ρίζες, οι οποίες όμως δεν είναι δραστικές. Η αντιοξειδωτική άμυνα εμφανίζει διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ιστών και κυτταρικών τύπων. Επιπλέον τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε ενδογενή και εξωγενή καθώς υπάρχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση που λαμβάνονται με την τροφή. Επιπλέον, ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να διαχωριστούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά (Πίνακας 2).

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	
ΜΕΓΑΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ
<p><u>Ένζυμα:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δισμουτάση του υπεροξειδίου</li> <li>• Καταλάση</li> <li>• Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης</li> <li>• Περοξυρεδοξίνες</li> <li>• Θειορεδοξίνες</li> </ul>	<p><u>Λιποδιαλυτά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε).</li> <li>• Καροτενοειδή.</li> <li>• Ουβικινόνη</li> <li>• Πολυφαινόλες.</li> </ul>
<p><u>Μη ενζυμικά (πρωτεΐνες)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αλβουμίνη.</li> <li>• Σερουλοπλασμίνη.</li> <li>• Τρανσφερίνη.</li> <li>• Απτοσφαιρίνη.</li> </ul>	<p><u>Υδατοδιαλυτά</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).</li> <li>• Ουρικό οξύ .</li> <li>• Πολυφαινόλες.</li> <li>• Χολερυθρίνη</li> <li>• Φλαβονοειδή (κατεχίνες, ανθοκυανιδίνες, φλαβόνες)</li> </ul>

**Πίνακας 2:** Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά.

### **1.5. Οξειδωτικό στρες-ορισμός**

Η ρήξη της ισορροπίας ανάμεσα στο σχηματισμό των ελεύθερων ριζών και στην εξουδετέρωσή τους από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που έχει σαν συνέπεια την ανεξέλεγκτη παραγωγή τους και ευνοεί την οξειδωτική προσβολή ή προοξειδωτικές καταστάσεις, χαρακτηρίζεται οξειδωτικό στρες [56].

Σε φυσιολογικές συνθήκες η ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και το αντιοξειδωτικό σύστημα συντηρείται ελαφρά υπέρ των ελεύθερων ριζών προκειμένου να εκπληρώσουν τους φυσιολογικούς τους ρόλους [2]. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί αποτρέπουν την καταστροφική τους δράση και παράλληλα επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των οξειδωτικών βλαβών λειτουργούν ακόμα και σε υγιές επίπεδο [5,57].

### **1.6. Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.**

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν εξαιρετικά ελάχιστο χρόνο ημίσειας ζωής με αποτέλεσμα η απευθείας μέτρηση τους σε κλινικό περιβάλλον να είναι αδύνατη [58,59]. Για το λόγο αυτό η καταγραφή τους πραγματοποιείται έμμεσα με τον προσδιορισμό βιοδεικτών που προκύπτουν είτε από την μέτρηση σταθερών παραγώγων που σχηματίζουν οι ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδρασή τους με τους κυτταρικούς στόχους, είτε από την μέτρηση ενζύμων που μετέχουν στις οξειδοαναγωγικές διαδικασίες ή ενζυμικών προϊόντων [60].

Προς το παρόν οι βιοδείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα νοσήματα, καθώς και οι μέθοδοι προσδιορισμού τους, ποικίλουν από μελέτη σε μελέτη καθιστώντας δύσκολη την συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον η αξιοπιστία ορισμένων βιοδεικτών δεν έχει κατοχυρωθεί.

Τα κύρια προβλήματα που συχνότερα παρουσιάζουν οι μέθοδοι ανίχνευσης του οξειδωτικού στρες στο σύνολό τους, είναι η χαμηλή ειδικότητα για το συγκεκριμένο υπόστρωμα μέτρησης, η έλλειψη επαρκούς ευαισθησίας για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός βιοδείκτη σε υγιείς ώστε να είναι δυνατή η θέσπιση ορίων αναφοράς, το γεγονός ότι η ουσία που μετράται μπορεί να μην είναι ειδικό παράγωγο συγκεκριμένης ρίζας ή ότι η συγκέντρωσή της μπορεί να επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες όπως η δίαιτα. Τέλος ο βαθμός παρεμβατικότητας μιας μεθόδου μπορεί να την καθιστά δύσκολη για κλινική εφαρμογή [61].

**A.Βιοδείκτες οξείδωσης λιπιδίων.** Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες οξείδωσης των λιπιδίων είναι οι: μαλονδυαλδεΰδη (Malondialdehyde-MDA), η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (4-hydroxy-2-nonenal-HNE), οι αντιδρώσες-ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) και τα ισοπροστάνια (F2-isoprostanes).

Η MDA είναι μία κετοαλδεΰδη που παράγεται από την οξείδωση των ακόρεστων λιπιδίων σαν παραπροϊόν του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Συνδεέται με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, κυρίως με υπολείμματα λυσίνης μέσω της αντίδρασης Michael, σχηματίζοντας τροποποιημένα παράγωγα πρωτεΐνης που αλλοιώνουν τις βιολογικές της ιδιότητες. Το γεγονός αυτό έχει αναδειχθεί και έχει ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης [62].

Τα TBARS είναι μια τροποποιημένη μέθοδος που προσδιορίζει κυρίως την MDA χρησιμοποιώντας το θειοβαρβιτουρικό οξύ [61].

Η HNE είναι μια πολύ τοξική αλδεΰδη που δημιουργείται από την επίθεση των ελεύθερων ριζών στα ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αντιδρά με πρωτεΐνες, πεπτίδια, φωσφολιπίδια και νουκλεϊκά οξέα επιδεικνύοντας σαφή κυτταροτοξική

και μεταλλαξιογόνο δράση ενώ επηρεάζει και σηματοδοτικές οδούς [63]. Έχει βρεθεί αυξημένη κατά 3-10 φορές στον ορό σε ρευματολογικές νόσους, λεμφοίδημα, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης αυξάνει πρώιμα στη νόσο του Alzheimer ενώ παράγωγα της HNE με πρωτεΐνες έχουν ανιχνευθεί στην καρδιαγγειακή νόσο και σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [61,64,65].

Τα F2-ισοπροστάνια (F2-IsoPs) είναι μια μεγάλη οικογένεια 64 σύνθετων μορίων τύπου προσταγλανδίνης που περιέχουν ένα F-δακτύλιο προστανίου. Σχηματίζονται *in vivo* από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος και στη συνέχεια αποδομούνται και απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία από τις φωσφολιπάσες για να απεκκριθούν στα ούρα σαν ελεύθερα ισοπροστάνια. Λόγω της σταθερότητας τους θεωρούνται ένας ακριβής και αξιόπιστος τρόπος μέτρησης της λιπιδιακής οξείδωσης σε πραγματικές συνθήκες. Η 8-ισο-προσταγλανδίνη-F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στις μελέτες μέχρι σήμερα [61].

Τα ισοπροστάνια έχουν ανιχνευθεί σε όλους τους ιστούς και στα περισσότερα βιολογικά υγρά όπως πλάσμα, ούρα, αρθρικό υγρό, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, χολή, λέμφο, αμνιακό, περικαρδιακό, σπερματικό υγρό. Για λόγους ευκολίας, το πλάσμα και τα ούρα είναι τα προτιμώμενα υποστρώματα για μετρήσεις [66,67]. Στο πλάσμα τα ισοπροστάνια βρίσκονται είτε εστεροποιημένα με λιπίδια που είναι και η πιο άφθονη μορφή είτε σαν ελεύθερα οξέα ενώ στα ούρα απεκκρίνεται η υδρολυμένη μορφή [61].

Ο προσδιορισμός τους γίνεται με χρωματογραφικές, ανοσοενζυμικές μεθόδους και με την χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων. Αυξημένα επίπεδα 8-iso-PGF<sub>2α</sub> στο πλάσμα έχουν διαπιστωθεί σε υγιείς χρόνιους καπνιστές και σε πολλές πνευμονοπάθειες συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας αποφρακτικής, στο άσθμα,

στην ινοκυστική νόσο, διάμεση πνευμονοπάθεια, πνευμονική υπέρταση, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων. Επίσης σε ρευματικά νοσήματα, αθηροσκλήρωση, ισχαιμία μυοκαρδίου και ασταθή στηθάγχη, μετά από καρδιοπνευμονικό μπαι-πας, σε οξύ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ούρα έχουν καταγραφεί σε παιδιά με το συγγενές σύνδρομο Zellweger [66,68-70].

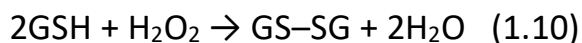
**Β.Βιοδείκτες οξείδωσης DNA.** Αρκετές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για να προσδιοριστεί η οξειδωτική βλάβη στις βάσεις του DNA. Η ουσία που συνήθως προσδιορίζεται είναι η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-Oxo-2'-deoxyguanosine-8OHdG) [49,71,72]. Καμμία μέθοδος ωστόσο δεν μπορεί να προσδιορίσει την ακριβή εντόπιση της βλάβης στο DNA ούτε είναι εφικτή η χρησιμοποίηση όλων των ιστών για την εξαγωγή του και συνήθως χρησιμοποιείται DNA που απομονώνεται από λεμφοκύτταρα ή λευκοκύτταρα [73]. Η μέτρησή της 8OHdG στα ούρα έχει χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης οξείδωσης του DNA στο σύνολο του οργανισμού ωστόσο υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί [74].

**Γ.Βιοδείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών.** Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyls-CO) δημιουργούνται από την οξείδωση αμινοξέων των πλάγιων αλυσίδων (λυσίνης, αργινίνης, προλίνης, θρεονίνης) των πρωτεϊνών που αντιδρούν με  $\alpha,\beta$ -ακόρεστες αλδεΐδες και υδατάνθρακες σχηματίζοντας τελικά προϊόντα προχωρημένης λιπιδικής και γλυκοτελικής οξείδωσης (ALEs Advanced Lipid peroxidation End products και AGEs Advanced Glycation End products). Η μέτρησή τους αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών τόσο στο εργαστήριο όσο και σε πραγματικές συνθήκες επειδή η χημική τους σταθερότητα επιτρέπει την άμεση μέτρηση αλλά και την αποθήκευση [61, 75-77].

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια έχει διαπιστωθεί πως αυξάνονται κατά το γήρας, σε περιπτώσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, χρόνια φλεγμονή, ινοκυστική νόσο, σακχαρώδη διαβήτη και υπερχοληστερολαιμία. Στη νόσο του Alzheimer έχουν αναγνωριστεί συγκεκριμένες καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες στον εγκεφαλικό ιστό και στο πλάσμα των ασθενών ενώ σε παιδιά με χρόνια νεανική αρθρίτιδα διαπιστώθηκε πως αυξάνουν παράλληλα με την δραστηριότητα της νόσου [61].

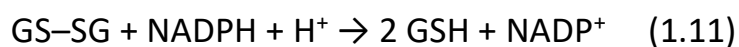
**Δ. Άλλοι-Γλουταθειόνη και γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες.** Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλ-κυστεΐνυλ-γλυκίνη) είναι ένα τριπεπτίδιο που παράγεται από τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών και ένας από τους κύριους μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες. Συντίθεται σε δύο φάσεις: στην πρώτη η γλουταμίνη και η κυστεΐνη συνδέονται με την δράση του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης ή λιγκάση του γλουταμικού-κυστεΐνης ((GCL) και σχηματίζουν γ-γλουταμυλκυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης επειδή παρέχει τον σουλφυδρυλικό δεσμό που οξειδώνεται ανάγοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στη δεύτερη φάση η γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη συνδέεται με την γλυκίνη και έτσι ολοκληρώνεται το μόριο της γλουταθειόνης [78].

Χρησιμοποιώντας την γλουταθειόνη σαν υπόστρωμα, το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase-GPx) αδρανοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου και σχηματίζει νερό ενώ παράλληλα συνδέει δύο μόρια γλουταθειόνης με δισουλφιδικό δεσμό σχηματίζοντας την οξειδωμένη γλουταθειόνη GSSG (αντίδραση 1.10)



Η ανηγμένη γλουταθειόνη μπορεί να ανασυσταθεί με την δράση της ρεδοκτάσης

της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR ή glutathione disulfide-reductase-GSR) που χρησιμοποιεί σαν συμπαράγοντα το συνένζυμο NADPH (αντίδραση 1.11):



Η μέτρηση της οξειδωμένης και της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αίμα που πραγματοποιείται με αρκετές μεθόδους, εκτιμάται ότι αντανακλά την συνολική εικόνα και ο λόγος GSH:GSSG θεωρείται βασικός δείκτης της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού [61].

Χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης έχουν αναφερθεί με την πάροδο της ηλικίας, σε ρευματοειδή αρθρίτιδα, πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση, νόσο Alzheimer, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, αλκοολική ηπατοπάθεια, σύνδρομο Werner. Χαμηλή γλουταθειόνη και μειωμένος λόγος GSH:GSSG ενδεικτικά οξειδωτικού στρες, έχουν διαπιστωθεί σε εγκεφαλική ισχαιμία, καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη, καρκίνο μαστού και πνευμόνων, προεκλαμψία [79-82].

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες η οξείδωση της κυστεΐνης των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μικτών δισουλφιδίων μεταξύ των ομάδων θειόλης των πρωτεϊνών και της γλουταθειόνης (S-glutathionylation). Επίσης η άθροιση της GSSG στο κύτταρο μπορεί να οδηγήσει σε δισουλφιδικούς δεσμούς με πρωτεϊνικές θειόλες [61]. Οι γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί σαν πιθανοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες σε καταστάσεις όπως το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και ο διαβήτης. Η γλουταθειονυλιωμένη αιμοσφαιρίνη είναι αυξημένη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και 2, υπερλιπιδαιμία και σε όσους υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή διάλυση [83,84].

### **1.7. Οξειδωτικό στρες σε διάφορες παθήσεις.**

Η παρουσία του οξειδωτικού στρες έχει διαπιστωθεί σε οξείες και χρόνιες παθήσεις συμπεριλαμβανομένου του γήρατος ωστόσο αντικείμενο διερεύνησης αποτελεί η αιτιοπαθογενετική συσχέτιση μεταξύ τους [61].

#### **Καρκίνος**

Η οξειδωτική προσβολή που προκαλεί μόνιμες τροποποιήσεις του γενετικού υλικού είναι ένα σημαντικό βήμα προς την μεταλλαξιογένεση και στην συνέχεια την καρκινογένεση και την γήρανση. Η ύπαρξη οξειδωτικών βλαβών σε περιοχές του DNA έχει τεκμηριωθεί σε διάφορους καρκινικούς όγκους. Αυτές αφορούν σπάσιμο μονής ή διπλής έλικας, τροποποιήσεις των βάσεων πουρίνης, πυριμιδίνης ή του ιστού της δεοξυριβόζης και χιασμούς ελίκων. Η οξειδωτική βλάβη του DNA καταλήγει σε αναστολή ή επαγωγή της μεταγραφής στο επίπεδο του κυττάρου, σε επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών, σε λάθη μεταγραφής και αστάθεια του γονιδιώματος τα οποία συνδέονται με την καρκινογένεση [85,86]. Τουλάχιστον 100 οξειδωμένα παράγωγα του DNA έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα με πιο μελετημένο το σχηματισμό της 8-OH-G. Εκτός από τις ελεύθερες ρίζες, και τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης όπως το MDA έχει βρεθεί πως είναι μεταλλαξιογόνο για βακτήρια και κύτταρα θηλαστικών ενώ εμφανίζει καρκινογόνο δράση σε ποντίκια [52].

Οξειδωτική βλάβη προκαλούν επίσης και οι ελεύθερες ρίζες του αζώτου και μέταλλα ή εξωγενείς παράγοντες όπως ο σίδηρος, το κάδμιο, παράγωγα του αρσενικού, ο καπνός, που έχουν την ικανότητα είτε να παράγουν ελεύθερες ρίζες ή να δεσμεύουν θειόλες που δρουν αναγωγικά, τα οποία έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση [7, 12,87,88].



Ανωμαλίες σε μηχανισμούς σηματοδότησης που επηρεάζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η αύξηση μπορούν να οδηγήσουν στη γένεση του καρκίνου. Η συμπεριφορά των νεοπλασματικών κυττάρων εμφανίζει μεταβολές σε οδούς ενδοκυττάριας σηματοδότησης που αφορούν σε υποδοχείς ή τυροσινικές κινάσες του κυτταροπλάσματος, αλλοιωμένα επίπεδα ειδικών αυξητικών παραγόντων και αλλαγές στην μετάδοση μηνυμάτων προς τον πυρήνα, σε τμήματα της μεταγραφικής συσκευής και σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και την αντιγραφή του DNA. Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στις παραπάνω διαδικασίες με πολύπλοκο τρόπο που σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων και την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως οι MAPK/AP-1 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση και ο NF-κΒ που σχετίζεται με την διαφοροποίηση, την κυτταρική αύξηση και την αγγειογένεση [37].

Επίσης επηρεάζουν την δράση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων όπως ο EGF, PDGF, VEGF που αυξημένη έκφρασή τους έχει παρατηρηθεί σε καρκίνους του πνεύμονα και του ουροποιητικού [89] και προκαλούν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p53 που καταστέλλει τον όγκο και εμποδίζει την νεοαγγειογένεση [90,91].

Ο κύκλος ζωής του κυττάρου επηρεάζεται από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες ενδοκυττάρια και ιδιαίτερα από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης [92]. Σε γενικές γραμμές είναι γνωστό πως ένα αναγωγικό περιβάλλον στο κύτταρο ευνοεί τον πολλαπλασιασμό ενώ ένα ελαφρά οξειδωτικό περιβάλλον την διαφοροποίηση και σε πιο έντονο βαθμό, την απόπτωση και την νέκρωση. Το σύστημα της γλουταθειόνης μέσω του κυτοχρώματος c επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου Bcl-2 ασκώντας ρυθμιστικό ρόλο στην απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό. Υπερέκφραση του Bcl-2, που εμποδίζει την απόπτωση, παρατηρείται στα καρκινικά

κύτταρα [92]. Αρκετές μελέτες τεκμηριώνουν την συσχέτιση μεταξύ των διαταραχών της λειτουργίας ενζύμων που συνδέονται με το σύστημα της γλουταθειόνης όπως οι S-τρανσφεράσες (GSTs) με την επίπτωση του καρκίνου [93].

Θα μπορούσε να προτείνει κανείς την θεραπευτική λήψη αντιοξειδωτικών στους καρκινοπαθείς όμως για τους παραπάνω λόγους η χορήγηση αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με καρκίνο απαιτεί μεγάλη προσοχή και εξαρτάται από το στάδιο της νόσου κατά το οποίο θα χορηγηθούν [20,94]. Χορήγησή τους κατά την θεραπεία σε φάση απόπτωσης, μπορεί να οδηγήσει στην παράταση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων ενώ κατά την πρόοδο της νόσου μπορεί να ευνοήσει τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση του όγκου.

### **Καρδιακά νοσήματα**

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε μια σειρά νόσων του καρδιαγγειακού όπως η αθηρωσκλήρωση [95], η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση [96], καρδιομυοπάθειες, καρδιακή υπερτροφία και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [97]. Εκτός από την άμεση προσβολή φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών του μυοκαρδιακού κυττάρου που προκαλεί διαταραχές της διαπερατότητας, διάσπαση μεμβρανών, τροποποιήσεις πρωτεϊνών, βλάβη οργανυλίων, από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλείται και αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου είτε με απευθείας δράση τους σε πρωτεΐνες συνδεδεμένες με το ασβέστιο είτε έμμεσα από τη λιπιδιακή υπεροξείδωση της μεμβράνης. Η σημασία της υπερφόρτωσης με ασβέστιο για την πρόκληση μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας είναι γνωστή και αποτελεί κοινό παρονομαστή για την υπερπλασία του έσω χιτώνα των αγγείων, την αγγειοσυσπασση των αρτηριών και την καρδιακή υπερτροφία [98,99]. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών μέσω της

οξειδωμένης χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDLox) συντελεί στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας [95].

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι ελεύθερες ρίζες προάγουν την ιστική μυοκαρδιακή βλάβη είναι η εξάλειψη της διαθεσιμότητας του NO• [100]. Η S-νιτροζυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί την οδό με την οποία το NO• ρυθμίζει την λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων, την απόδοση οξυγόνου στους ιστούς, την συσπαστικότητα της καρδιάς [101]. Οι ελεύθερες ρίζες παρεμβαίνουν στις λειτουργίες αυτές οξειδώνοντας τις πρωτεΐνες στη θέση της θειόλης που αντιδρά με το NO•. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι σχετικές συγκεντρώσεις του μονοξειδίου και του σουπεροξειδίου και η χωροθέτηση των συνθετασών του μονοξειδίου και των οξειδασών καθορίζουν την ροή των γεγονότων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση του μονοξειδίου είναι μεγαλύτερη και ευνοεί την πρωτεϊνική S-νιτροζυλίωση [102]. Η ανισορροπία μονοξειδίου/σουπεροξειδίου, χαρακτηριστικό της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας [103,10], δημιουργεί οξειδωτικές καταστάσεις που διακόπτουν τον παραπάνω μηχανισμό [101].

Ακόμη οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται πως προάγουν την ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning) ενεργοποιώντας το μιτοχονδριακό κανάλι K<sup>+</sup> ATP [105,106].

Μαζική παραγωγή ελεύθερων ριζών παρατηρείται σε συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης όπως συμβαίνει σε έμφραγμα, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, μεταμόσχευση οργάνου [107]. Κατά την ισχαιμία η μεγάλη κατανάλωση ATP οδηγεί στην άθροιση των πουρινικών μεταβολιτών υποξανθίνης και ξανθίνης στα ουδετερόφιλα που κατά την επαναιμάτωση με την εισροή του οξυγόνου και την δράση της ξανθινικής οξειδάσης παράγουν μεγάλες ποσότητες σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου [108].

### **Ρευματοειδής αρθρίτιδα**

Η παθογένεση της νόσου συνδέεται κυρίως με το σχηματισμό ελεύθερων ριζών στο σημείο της φλεγμονής. Αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων και προσταγλανδινών έχουν διαπιστωθεί στον ορό και το αρθρικό υγρό των ασθενών. Οξειδωτικές συνθήκες συνδέονται με μεταλλάξεις της πρωτεΐνης p53 στο αρθρικό υγρό [109] ενώ και τα Τ-λεμφοκύτταρα του υγρού εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης [110]. Επίσης σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμιζόμενα από το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον προκαλούν ανώμαλη έκφραση μορίων προσκόλλησης (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) και μετανάστευση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στο αρθρικό υγρό [111].

### **Σακχαρώδης διαβήτης**

Η υπεργλυκαιμία επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών και το οξειδωτικό στρες θεωρείται ένα από τα κύρια αίτια των διαβητικών επιπλοκών. Πηγές προέλευσης είναι τα μιτοχόνδρια με παραγωγή σουπεροξειδίου από το σύμπλεγμα II της αναπνευστικής αλυσίδας αντι του I και III σε φυσιολογικές συνθήκες [112], οι NAD(P)H οξειδάσες στο αγγειακό δίκτυο και τα νεφρικά κύτταρα που αποτελούν έναν φορέα διαβητικών επιπλοκών [113], η ξανθινική οξειδάση ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκεται [114], οι λιποξυγενάσες που διασπούν το αραχιδονικό οξύ ενώ και η αυτοοξειδωση της γλυκόζης προτείνεται ως πιθανός μηχανισμός [115]. Ακόμη η υπεργλυκαιμία σχετίζεται με την ρύθμιση της έκφρασης των συνθετασών του μονοξειδίου και την παραγωγή ελεύθερων ριζών αζώτου [116]. Να σημειωθεί ότι στο διαβήτη έχει παρατηρηθεί εξάλειψη αντιοξειδωτικών όπως των βιταμινών E και C [117].

Η ινσουλίνη συνδέεται με τους υποδοχείς της στα όργανα στόχους. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα πρωτεΐνες (IRS1, IRS2) τις οποίες φωσφορυλιώνει για να ενεργοποιηθούν διαφορετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στη μεταβολική δράση της ινσουλίνης. Η φωσφορυλίωση της IRS1 σε θέση τυροσίνης διεγείρει τις δράσεις της ινσουλίνης ενώ αν συμβεί σε θέση σερίνης μπορεί είτε να ευοδώσει είτε να τερματίσει την δράση της. Η κατεύθυνση της ισορροπίας μεταξύ των δύο οδών επηρεάζεται από παράγοντες όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ο TNFα και το οξειδωτικό στρες που επιδρούν αρνητικά στον IRS1 [118].

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη και διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. Σήμερα θεωρείται πως ένα από τα σημαντικά αίτια πρόκλησής του αποτελούν επαγόμενα από το οξειδωτικό στρες ελλείμματα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και την μιτοχονδριακή β-οξείδωση, που οδηγούν στη συσσώρευση ενδοκυττάρων τριγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό και το ήπαρ και στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη [119]. Στην πορεία τα β-κύτταρα του παγκρέατος αδυνατούν να αντιμετωπίσουν τις αυξημένες ανάγκες λόγω της αντίστασης στην ινσουλίνη με αποτέλεσμα να παρατηρείται διαταραχή της ανοχής στη γλυκόζη και μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Τα β-κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική προσβολή γιατί περιέχουν χαμηλή ποσότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση, η σουπεροξειδική δισμουτάση και η οξειδάση της γλουταθειόνης [120,121]. Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβη στα μιτοχόνδρια των β-κυττάρων και παρεμποδίζει την έκκριση της ινσουλίνης [122].

## **Νευρολογικές διαταραχές**

Ο εγκεφαλικός ιστός είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην οξειδωτική βλάβη λόγω της υψηλής κατανάλωσης οξυγόνου, της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που μπορούν να οξειδωθούν και της παρουσίας οξειδωτικά ενεργών μετάλλων (Cu, Fe). Το οξειδωτικό στρες αυξάνει με την ηλικία και θα μπορούσε να θεωρηθεί αιτιολογικός παράγοντας σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα που απαντώνται συχνότερα στις μεγαλύτερες ηλικίες όπως η νόσος του Alzheimer [123,124] και του Parkinson [125,126].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ**

Η σήψη περιγράφηκε για πρώτη φορά στην αρχαιότητα από τον Ιπποκράτη. Ο Γαληνός την θεώρησε απαραίτητη για την επούλωση πληγών [127]. Στα χρόνια που ακολούθησαν και όσο η παρατήρηση και η έρευνα διεύρυναν το γνωστικό πεδίο στο χώρο της ιατρικής, η αντίληψη για την παθογένεια του φαινομένου επεκτάθηκε στην εικόνα μιας συστηματικής προσβολής για την οποία εκτός από τον μικροβιακό παράγοντα υπεύθυνο ρόλο διαδραματίζει και ο ξενιστής με τα χαρακτηριστικά του.

Για πρώτη φορά το 1992, το Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρών Θώρακα (American College of Chest Physicians-ACCP) και η Εταιρεία Εντατικής Θεραπείας (Society of Critical Care Medicine-SCCM) προσδιόρισαν την σήψη από την παρουσία συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης σε συνδυασμό με την επιβεβαιωμένη ύπαρξη μικροβιακού παράγοντα [128].

## 2.1. Ορισμοί

Ως συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση (SIRS) χαρακτηρίζεται το σύνδρομο που συνοδεύεται από περισσότερα από ένα από τα παρακάτω κριτήρια:

- Εμπύρετο  $> 38.3^{\circ}\text{C}$  ή υποθερμία  $T < 36^{\circ}\text{C}$
- Καρδιακή συχνότητα  $> 90$  σφύξεις/ λεπτό
- Αναπνευστική συχνότητα  $> 20$  αναπνοές/λεπτό ή μερική πίεση διοξειδίου στο αρτηριακό αίμα  $\text{PaCO}_2 < 32\text{mm Hg}$
- Τιμή λευκών αιμοσφαιρίων  $> 12000/\text{mm}^3$  ή  $< 4000/\text{mm}^3$  ή  $> 10\%$  άωρες μορφές

Μεταγενέστερα υπήρξαν τροποποιήσεις στον αρχικό ορισμό της σήψης και το 2012 στα πλαίσια μιας διεθνούς εκστρατείας για την καταπολέμηση της, που απαρτίζεται από την Αμερικανική, την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Θεραπείας και το Διεθνές Φόρουμ της Σήψης—του Surviving Sepsis Campaign—διαμορφώθηκε ένας εκτεταμένος ορισμός για να περιγράψει πληρέστερα το ευρύ φάσμα των κλινικών και εργαστηριακών εκδηλώσεων που απαντώνται στη σήψη [129].

Σήμερα λοιπόν, η σήψη καθορίζεται από την υποψία ή την απόδειξη ύπαρξης λοίμωξης σε συνδυασμό με περισσότερα από ένα, από τα παρακάτω:

### Γενικές παράμετροι

Πυρετός  $> 38,3^{\circ}\text{C}$

Υποθερμία (θερμοκρασία πυρήνα  $< 36^{\circ}\text{C}$ )

Καρδιακή συχνότητα  $> 90$  σφύξεις/ λεπτό ή μεγαλύτερη από 2 σταθερές αποκλίσεις της φυσιολογικής τιμής για την ηλικία.

Ταχύπνοια

Αλλοιωμένο επίπεδο συνείδησης

Σημαντικό οίδημα ή θετικό ισοζύγιο υγρών (>20 ml/kg σε 24 ώρες)

Υπεργλυκαιμία –γλυκόζη πλάσματος >140 mg/dL απουσία διαβήτη

### **Φλεγμονώδεις παράμετροι**

Λευκοκυττάρωση αριθμός λευκών > 12000/mm<sup>3</sup>

Λευκοπενία αριθμός λευκών < 4000/mm<sup>3</sup>

Φυσιολογικός αριθμός λευκοκυττάρων με περισσότερο από 10% άωρες μορφές

C-αντιδρώσα πρωτεΐνη πλάσματος μεγαλύτερη από 2 σταθερές αποκλίσεις της φυσιολογικής τιμής.

Προκαλσιτονίνη πλάσματος μεγαλύτερη από 2 σταθερές αποκλίσεις της φυσιολογικής τιμής.

### **Αιμοδυναμικές παράμετροι**

Αρτηριακή υπόταση, συστολική αρτηριακή πίεση < 90 mm Hg, μέση αρτηριακή πίεση < 70 mm Hg, ή πτώση της συστολικής πίεσης > 40 mm Hg στους ενήλικες ή περισσότερο από 2 σταθερές αποκλίσεις κάτω από το φυσιολογικό για την ηλικία όριο.

### **Παράμετροι οργανικής ανεπάρκειας**

Αρτηριακή υποξαιμία (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 300)

Οξεία ολιγουρία, παραγωγή ούρων < 0.5 ml/kg/hr για τουλάχιστον 2 ώρες παρά την επαρκή ενυδάτωση

Αύξηση κρεατινίνης > 0.5 mg/dL

Διαταραχές πήκτικότητας ( INR > 1.5 ή aPTT > 60 s)

Ειλεός (απόντες εντερικοί ήχοι)

Θρομβοπενία αριθμός αιμοπεταλίων < 100.000/ mm<sup>3</sup>

Υπερχολερυθριναιμία ολική χολερυθρίνη πλάσματος > 4 mg/dL



### **Παράμετροι ιστικής παροχής**

Αύξηση γαλακτικού > 1 mmol/L

Καθυστερημένη τριχοειδική επαναπλήρωση ή δικτυωτή πελίωση.

### **Βαρύτητα της σήψης**

Η σήψη κατηγοριοποιείται σε σήψη, σοβαρή σήψη και σηπτική καταπληξία.

Σοβαρή σήψη: είναι η σήψη που συνοδεύεται από ιστική υποάρδευση ή δυσλειτουργία οργάνου εξαιτίας της υπάρχουσας λοίμωξης.

Σηπτική καταπληξία (shock): είναι η σήψη που συνοδεύεται από οξεία αιμοδυναμική κατέρρευση (συστολική αρτηριακή πίεση < 90 mm Hg, μέση αρτηριακή πίεση < 70 mm Hg, ή πτώση της συστολικής πίεσης > 40 mm Hg στους ενήλικες ή περισσότερο από 2 σταθερές αποκλίσεις κάτω από το φυσιολογικό για την ηλικία όριο) η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλο αίτιο, και χαρακτηρίζεται από επίμονη και μη αντιρροπούμενη υπόταση παρά την επαρκή χορήγηση υγρών.

## 2.2. Σήψη: επίπτωση-έκβαση

Τα περιστατικά της σήψης είναι περισσότερα από 750.000/έτος στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου η σοβαρή σήψη εμφανίζει επίπτωση 300 περιπτώσεων ανά 100.000 πληθυσμού [130] και αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου συνολικά [131]. Οι μισές περιπτώσεις εντοπίζονται εκτός της μονάδας εντατικής θεραπείας. Στην Ευρώπη η σήψη και η σοβαρή σήψη απαντώνται σε ποσοστό 30% και 37% αντίστοιχα στους ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας [132], είναι ένα από τα πιο κοινά αίτια νοσηλείας σε μονάδα και η πιο συχνή αιτία θανάτου με ποσοστό θνητότητας που αγγίζει το 30% για την σοβαρή σήψη και το 50% για την σηπτική καταπληξία [130,133]. Τα ποσοστά αυτά ακόμη και σήμερα παραμένουν υψηλά παρά την βελτίωση στην υποστήριξη των οργάνων, στα μέσα παρακολούθησης, στην άμεση έναρξη της θεραπείας, στα μέτρα επιτήρησης και στην συνεχιζόμενη εκπαίδευση. Ένας από τους λόγους για την αυξημένη επίπτωση της σήψης στις αναπτυγμένες χώρες είναι η γήρανση του πληθυσμού και η αύξηση της χρόνιας νόσου [134].

Η παιδική και η μεγάλη ηλικία (>65 χρόνων), το ανδρικό φύλο και η μαύρη φυλή εμφανίζουν μεγαλύτερη επίπτωση σοβαρής σήψης ενώ παράγοντες κινδύνου αποτελούν η χρήση ανοσοκατασταλτικών και οι λοιμώξεις σε έδαφος χρόνιων παθήσεων. Ιδιαίτερα εξετάζεται η συμβολή των γενετικών χαρακτηριστικών καθώς έχουν αναγνωριστεί κληρονομικοί παράγοντες κινδύνου [135].

Το ενδιαφέρον σήμερα, εκτός από την άμεση θνητότητα, εστιάζεται πια και στις δευτερογενείς επιπλοκές. Όσοι εξέρχονται από το νοσοκομείο μετά από επεισόδιο σοβαρής σήψης εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα επανανοσηλείας, αυξημένη θνητότητα για το αμέσως επόμενο χρονικό διάστημα και για χρόνια μετά, συνοδεύονται από αναπηρίες, γνωσιακές δυσλειτουργίες, διαταραχές διάθεσης,

επηρεασμένη ποιότητα ζωής [133, 136].

Η οικονομική συνιστώσα αποτελεί μια άλλη σημαντική παράμετρο του νοσήματος. Η σήψη χαρακτηρίζεται από αυξημένο κόστος που στις Ηνωμένες Πολιτείες αγγίζει τα 20 δις δολάρια/έτος. Ενώ η βαρύτητα και η παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας θεωρήθηκαν υπεύθυνοι παράγοντες αρχικά, φαίνεται πως το μεγαλύτερο μέρος του κόστους αθροίζεται μετά την έξοδο και οφείλεται στην απώλεια της παραγωγικότητας [137].

Είναι λοιπόν προφανείς οι λόγοι για τους οποίους η σήψη αποτελεί παγκόσμια αντικείμενο ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας, των συστημάτων υγείας των φαρμακευτικών εταιρειών, θέμα για διεθνή συνέδρια, πειραματικές και κλινικές εργασίες και για τυχατοποιημένες πολυκεντρικές έρευνες με στόχο την κατανόηση σε βάθος των μηχανισμών του φαινομένου και την ανάπτυξη δραστικών θεραπειών.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ**

#### **3. 1. Η ανοσιακή απάντηση**

Η φλεγμονώδης απάντηση είναι η αμυντική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε παθογόνα που εισβάλλουν στον οργανισμό και μπορεί να είναι βακτήρια, ιοί καθώς και σε οτιδήποτε άλλο μπορεί να προκαλέσει την κινητοποίηση της όπως το τραύμα, το έγκαυμα, η νέκρωση ιστών, η ακτινοβολία, τα ξένα σώματα.

Στην απόκριση συμμετέχουν τόσο το ενδογενές όσο και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα. Το ενδογενές σύστημα (φυσική ανοσία) αναγνωρίζει μια μεγάλη ποικιλία

παθογόνων με την μεσολάβηση μιας οικογένειας υποδοχέων που ονομάζονται pattern-recognition receptors (PRRs). Αυτή περιλαμβάνει υποδοχείς συνδεδεμένους με την μεμβράνη των κυττάρων όπως οι Toll-like receptors (TLRs) και οι c-type lectin receptors καθώς και κυτταροπλασματικούς, τους nod-like receptors (NLRs). Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν περιοχές των μικροβίων γνωστές σαν pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) που μπορεί να είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων όπως πεπτιδογλυκάνες και λιποπολυσακχαρίδια, όμως αναγνωρίζουν και danger-associated molecular patterns (DAMPs) που εκλύονται από τα προσβεβλημένα κύτταρα όπως το dsDNA ή κρύσταλλοι ουρικού οξέως. Οι PRRs εκφράζονται σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα, γεγονός που επιτρέπει την πρώιμη ανίχνευση των παθογόνων [138]. Η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας οδηγεί στην έκκριση ποικίλων κυτοκινών και χημειοκινών προκειμένου να συναθροιστούν τα απαραίτητα κύτταρα στο σημείο της φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα που προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αφού μεταναστεύσουν, διαμέσου του αγγειακού τοιχώματος, στο σημείο της φλεγμονής για να αντιμετωπίσουν τον εισβολέα, εκκρίνοντας παράλληλα αγγειοδραστικούς και προφλεγμονώδεις μεσολαβητές [139]. Η έκλυση ισταμίνης, βραδυκινίνης, θρομβίνης, παραγόντων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAFs) στο σημείο της βλάβης αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα, προκαλεί οίδημα και εξαγγείωση λευκοκυττάρων. Εάν οι δυνατότητες των ενδογενών μηχανισμών δεν επαρκούν για την αντιμετώπιση της κατάστασης ενεργοποιείται η επίκτητη ανοσία με την στράτευση ειδικών T και B κυττάρων για την απομάκρυνση του παθογόνου [140].

Η έκλυση ελεύθερων ριζών συμμετέχει ουσιαστικά στην εξέλιξη της φλεγμονώδους διεργασίας. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα σαν απάντηση στο φλεγμονώδες ερέθισμα και παράλληλα προάγουν την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μέσω της οξείδωσης σημαντικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών για τα κύτταρα όπως οι φωσφατάσες της τυροσίνης. Λειτουργούν ταυτόχρονα και σαν μεσολαβητές της φλεγμονής και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σαν σηματοδοτικά μόρια.

### **3.2. Προέλευση ελεύθερων ριζών στη φλεγμονή**

Έχει προαναφερθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σαν παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού του οξυγόνου στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια καθώς και στο σύστημα του κυτοχρώματος CYP450 ενώ σαν κύριο προϊόν παράγονται από το σύστημα των NADPH οξειδασών, που συναντάται σε μια ποικιλία ιστών και ιδιαίτερα στα φαγοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία έχουν εξέχουσα θέση στη φλεγμονώδη απάντηση [141].

#### Ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από τις NADPH-οξειδάσες

Οι NADPH-οξειδάσες αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά στα φαγοκύτταρα από την ικανότητα παραγωγής οξειδωτικών παραγόντων για την καταστροφή των βακτηρίων [142,143]. Οι NOX1, NOX2, NOX4 είναι τα κύρια ισόμορφα της NADPH-οξειδάσης που αναγνωρίζονται στο αγγειακό σύστημα και συνδέονται με την αγγειακή βλάβη που προκαλεί η φλεγμονή [144].

Η καταλυτική περιοχή της κλασσικής φαγοκυτταρικής NADPH οξειδάσης (NOX2) αποτελείται από δύο συνδεδεμένες με την μεμβράνη υπομονάδες, την gp91<sup>phox</sup> και την gp22<sup>phox</sup>, που σχηματίζουν το σύμπλεγμα του φλαβοκυτοχρώματος b558. Το

σουπεροξειδιο που παράγεται στην περιοχή της  $gr91^{phox}$  στα λευκοκύτταρα είναι απαραίτητο για την καταστροφή των μικροβίων στα φαγολυσσοσώματα [145]. Για να είναι εφικτή η παραγωγή του προκαλείται μετακίνηση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων  $p47^{phox}$ ,  $p40^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  και της Rac1 προς την μεμβράνη και σχηματισμός συμπλέγματος με το κυτόχρωμα b558 που οδηγεί στην μετακίνηση  $H^+$  και στη δημιουργία  $NADP^+$  και σουπεροξειδίου. Η φωσφορυλίωση του  $p47^{phox}$  που ενεργοποιείται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως οTNF- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, από την LPS [146-150] και η ενεργοποίηση της Rac1 από τους TNF- $\alpha$  [151], ιντερλευκίνη-1 $\beta$ , θρομβίνη, VEGF, ισταμίνη [152], ισχαιμία-επαναιμάτωση [153], αγγειοτενσίνη II [154] είναι ουσιαστικοί παράγοντες για την σύσταση του συμπλέγματος της οξειδάσης.

Έχει βρεθεί επίσης ότι η σύνδεση του VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) στην επιφάνεια του ενδοθηλίου ενεργοποιεί την Rac1 που ευοδώνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών και προκαλεί απώλεια της σύνδεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την μετανάστευση λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου [155].

#### Ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από τα μιτοχόνδρια

Τα ηλεκτρόνια μεταναστεύουν κατά μήκος των τεσσάρων συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας αποδίδοντας ενέργεια, όμως το μικρό ποσοστό (1-2%) που διαφεύγει γεννά σουπεροξειδιο [156]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το σουπεροξειδιο προέρχεται κυρίως από το σύμπλεγμα III (ρεδουκτάση κυτοχρώματος c-ουβικινόλης) [157,158].

Με την κατάλυση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης σχηματίζεται  $H_2O_2$  που διαπερνά την μιτοχονδριακή μεμβράνη και ενεργοποιεί στο κυτταρόπλασμα μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο HIF-1 $\alpha$ , ο NF- $\kappa$ B και προφλεγμονώδεις

κυτοκίνες [159,160].

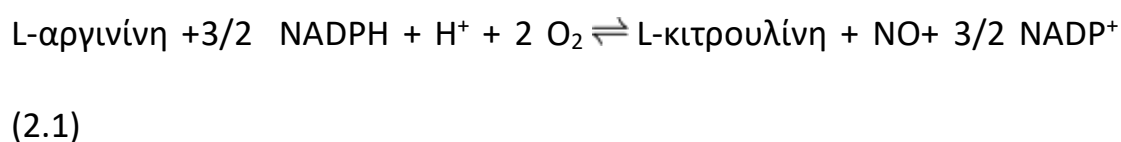
Οι προερχόμενες από τα μιτοχόνδρια ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στην παραγωγή IL-1β, IL-6, TNF-α που προκαλείται από τα λιποπολυσακχαρίδια (LPS) του βακτηριακού τοιχώματος και στην εξωκυττάρια χωροθέτηση του TNFR1 (TNF receptor-1) που είναι σημαντική για την πρόοδο της φλεγμονής [161].

Επίσης έχουν συνδεθεί με την χρόνια φλεγμονή, την πρόοδο του καρκίνου, τον σακχαρώδη διαβήτη, την αθηροσκλήρωση [162-167].

Άλλος σημαντικός τους ρόλος αφορά στην ρύθμιση συμπλεγμάτων υψηλού μοριακού βάρους, των φλεγμοσωμάτων (inflammasome) που ενεργοποιούν φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάση-1, 12) και κυτοκίνες (IL-1β, IL-8) στα μακροφάγα [168]. Ο τύπος φλεγμοσώματος NLRP3 ενεργοποιείται από τις μιτοχονδριακές ελεύθερες ρίζες [169]. Επίσης φαίνεται να προάγουν το οξειδωτικό στρες μέσω της διασύνδεσης τους με συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου ενώ σε πρόσφατες δημοσιεύσεις εμπλέκονται με την ρύθμιση της NADPH οξειδάσης [170,171].

#### Ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από συνθετάσες του NO

Οι συνθετάσες του NO είναι ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό μονοξειδίου του αζώτου από την L-αργινίνη (αντίδραση 2.1):



Υπάρχουν τρεις ισομορφές οι nNOS (neuronal), iNOS (inducible), eNOS (endothelial).

Η τελευταία συνδέεται με την μεμβράνη ενώ οι άλλες δύο βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Η eNOS είναι η κύρια πηγή μονοξειδίου για τα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Αποτελεί διμερές που σταθεροποιείται από την παρουσία

τετραϋδροβιοπτερίνης (BH<sub>4</sub>) [172] και καταλύει δύο διαδοχικές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων από το οξυγόνο για το σχηματισμό κιτρουλίνης από την αργινίνη ενώ ταυτόχρονα παράγεται NO σαν παραπροϊόν. Η έλλειψη τετραϋδροβιοπτερίνης που μπορεί να προκληθεί σε οξειδωτικές συνθήκες καταργεί το συνταίριασμα των αντιδράσεων και δημιουργεί ένα αδρανές παράγωγο (BH<sub>2</sub>) που δεν ανακυκλώνεται καθώς και O<sub>2</sub><sup>-</sup> [173,174].

Ο μηχανισμός αυτός έχει ενοχοποιηθεί σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η οξεία πνευμονική βλάβη (ALI) [175], ο σακχαρώδης διαβήτης [176], η επαγόμενη από την αγγειοτενσίνη-II υπέρταση [177].

#### Ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από την ξανθινική οξειδάση

Η ξανθινική οξειδάση (XO) είναι ένζυμο που βρίσκεται φυσιολογικά στον ορό και τους πνεύμονες και καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ παράγοντας υπεροξείδιο (αντίδραση 2.2 & 2.3):

- υποξανθίνη + H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>  $\rightleftharpoons$  ξανθίνη + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.2)
- ξανθίνη + H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>  $\rightleftharpoons$  ουρικό οξύ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.3)

Η δραστηριότητα της XO επάγεται από την IFN-γ στο μικροαγγειακό δίκτυο των πνευμόνων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας [178]. Η δράση της ξανθινικής οξειδάσης αυξάνεται σε μία σειρά από διαταραχές όπως η ισχαιμία-επαναιμάτωση, ο σακχ. διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονώδεις νόσοι των αεραγωγών [179]. Η υποξία επίσης αυξάνει τα επίπεδά της στον ορό [180].

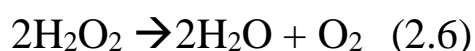


### 3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στη φλεγμονή

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα συνθέτουν την άμυνα του οργανισμού στην φλεγμονώδη οξειδωτική βλάβη. Αυτά είναι η σουπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, οι περοξυρεδοξίνες και οι θειορεδοξίνες.

Η σουπεροξειδική δισμουτάση έχει τρεις ισότυπους στον άνθρωπο: ο πρώτος περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZnSOD ή SOD1) είναι διμερές και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, σε κάποια λυσοσώματα και περοξυσώματα, στον πυρήνα, στο χώρο μεταξύ της έσω και έξω μεμβράνης των μιτοχονδρίων, ο δεύτερος διαθέτει στην ενεργό θέση μαγγάνιο (MnSOD ή SOD2), εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και είναι τετραμερές ενώ ο τρίτος περιέχει επίσης χαλκό και ψευδάργυρο έχει όμως διαφορετική δομή, είναι τετραμερές και εντοπίζεται εξωκυττάρια (ECSOD ή SOD3) [181-183]. Η ECSOD εκφράζεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και εκκρίνεται στο διάμεσο χώρο. Συνδέεται σε πολυανιονικές θέσεις στην εξωτερική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και λειτουργεί προστατευτικά για το NO [184].

Η οδός δράσης είναι η μετατροπή του σουπεροξειδίου στο λιγότερο δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια αδρανοποιείται από την καταλάση (αντίδραση 2.4, 2.5 & 2.6):



Και οι τρεις ισότυποι είναι παρόντες στους αεραγωγούς, στον πνευμονικό ιστό και στα αγγεία [181] όμως φαίνεται ότι οι SOD1 και 2 εκφράζονται περισσότερο στο ήπαρ, τους νεφρούς, την καρδιά, τον εγκέφαλο ενώ η SOD3 είναι δραστικότερη στον πνεύμονα [185]. Φαίνεται ότι η ειδική κατανομή και η σχετική συγκέντρωση τους σε κάθε ιστό καθορίζει και το ρόλο τους στη φλεγμονή.

Η καταλάση είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο που αποδομεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο όπως προαναφέρθηκε (αντίδραση 2.6) και εντοπίζεται ιδιαίτερα στα περοξυσώματα [186].

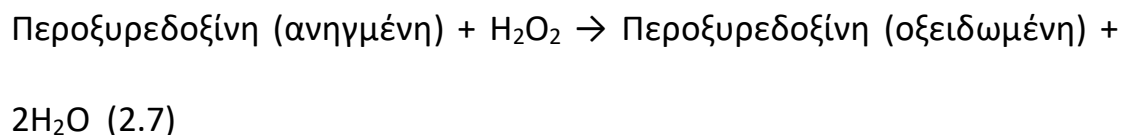
Η δραστηριότητά του αναγνωρίζεται σε όλους τους ιστούς ιδιαίτερα στα επιθηλιακά τύπου II κύτταρα των κυψελίδων και στα μακροφάγα και η πιο έντονη έκφρασή του έχει παρατηρηθεί στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα [187]. Η σημασία της καταλάσης στην παθογένεση της φλεγμονής δεν έχει μέχρι σήμερα διερευνηθεί.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αποτελεί μια οικογένεια ενζύμων που απαρτίζεται κυρίως από τέσσερα ισοένζυμα (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4) τα οποία διαφέρουν στην κυτταρική τους κατανομή και στο είδος του υποστρώματος που χρησιμοποιούν [188]. Είναι τετραμερή με εξαίρεση την GPx4 που είναι μονομερές και συνδέεται κυρίως με λιπιδικά υδροπεροξείδια άρα προστατεύει μεμβράνες και εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα [189]. Η GPx1 αφθονεί στο κυτταρόπλασμα, η GPx2 είναι εξωκυττάρια και εντοπίζεται στη γαστρεντερική οδό ενώ η GPx3 υπερτερεί στο πλάσμα. Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από το σελήνιο που περιέχουν στην καταλυτική τους περιοχή. Ο ρόλος τους είναι να αδρανοποιούν το  $H_2O_2$  οξειδώνοντας το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη που αφθονεί στο κυτταρόπλασμα όλων των ιστών και ιδιαίτερα στο ήπαρ σε διμερές δισουλφίδιο (αντίδραση 1.10).

Στη συνέχεια η GSSG μετατρέπεται σε GSH με την δράση της ρεδοκτάσης της

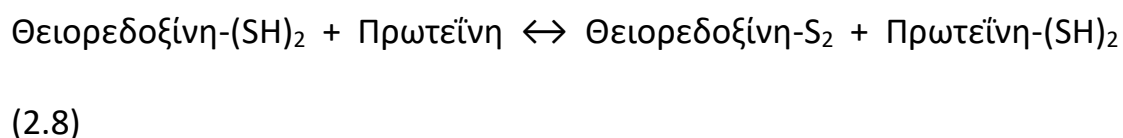
γλουταθειόνης (αντίδραση 1.11).

Οι περοξυρεδοξίνες είναι μία ομάδα ενζύμων, μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί έξι [190], που καταλύουν την αποδόμηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε νερό (αντίδραση 2.7):



Περιέχουν κυστεΐνη στην καταλυτική τους θέση. Όλες έχουν αναγνωρισθεί στον πνευμονικό ιστό. Η παρουσία τους εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στην μεμβάνη, στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Είναι η δεύτερη ή τρίτη πιο άφθονη πρωτεΐνη στα ερυθροκύτταρα [191]. Η αντιοξειδωτική τους δράση στη φλεγμονή έχει καταδειχθεί ως τώρα σε μελέτες σε ζώα [192]. Ένας άλλος σημαντικός τους ρόλος είναι στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης [193].

Οι θειορεδοξίνες είναι ένζυμα με μικρό μοριακό βάρος που συμμετέχουν σε αντιδράσεις αναγωγής με την συμμετοχή του NADPH και προστατεύουν την ακεραιότητα των πρωτεϊνών καταλύοντας αντιδράσεις θειόλης-δισουλφιδίου (αντίδραση 2.8):



Η πιο γνωστή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ενώ άλλη μία έχει εντοπισθεί στα μιτοχόνδρια και στους όρχεις [194]. Ο προστατευτικός τους ρόλος ως αντιοξειδωτικών ενζύμων έχει διαπιστωθεί σε αρκετές περιπτώσεις [195].

### 3.4. Οξειδωτικό στρες και μετακίνηση φλεγμονωδών κυττάρων

Η εξαγγείωση των ουδετερόφιλων της συστηματικής κυκλοφορίας κατά μήκος του ενδοθηλίου και η διαπίδυσή τους προς το σημείο της φλεγμονής πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου των συνάψεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (παρακυτταρική οδός) και σπανιότερα με ενδοκύττωση, διασχίζοντας δηλαδή το σώμα του ενδοθηλιακού κυττάρου (ενδοκυτταρική οδός) [196,197]. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τέσσερα βήματα: το κύλισμα των ουδετερόφιλων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από το φλεγμονώδες ερέθισμα που εξελίσσεται με την βοήθεια των σελεκτινών (P-selectins, E-selectins, L-selectins) [198], την δημιουργία ενός δυναμικού έλξης με την ενεργοποίηση  $\beta_2$ -ιντεγρινών από εκλυόμενες χημειοκίνες, την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την σύνδεση των ιντεγρινών με μόρια προσκόλλησης (CAMs, Cell Adhesion Molecules) όπως οι ICAM-1, VCAM-1 της υπερικογένειας των Ig [199,200] και τελικά τον πολυμερισμό του δικτύου ακτίνης του κυτταροσκελετού με συνέπεια να δημιουργούνται προσεκβολές που περιβάλλουν τα λευκοκύτταρα και προωθούν την διασυναπτική μετανάστευση [201-204].

Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων σχετίζεται με την ενδογενή παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [205]. Το οξειδωτικό στρες ρυθμίζει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια είτε με άμεση ενεργοποίησή τους είτε έμμεσα επηρεάζοντας τη δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- $\kappa$ B και η πρωτεΐνη AP-1 [206-208].

Τα επίπεδα στο αίμα των ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin σε υπερλιπιδαιμικούς και σακχαροδιαβητικούς τύπου II ασθενείς βρέθηκαν αυξημένα σε συσχέτισμό με

αυξημένο οξειδωτικό στρες [209-212].

### 3.5. Οξειδωτικό στρες και ενδοθήλιο

Το ενδοθήλιο αποτελεί μια ημιδιαπερατή μεμβράνη που επιτρέπει τη διέλευση μακρομορίων, φλεγμονωδών κυττάρων και υγρού μεταξύ του αίματος και του διάμεσου χώρου [213]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ με σταθερές συνδέσεις (TJ-Tight Junctions) που σχηματίζονται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι οκλουδίνες (occludins), οι κλοδίνες (claudins) και οι JAMs-Junctional Adhesion Molecules (CAMs της οικογένειας των Ig), οι οποίες συνέχονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και παράλληλα συνδέονται στο εσωτερικό κάθε κυττάρου με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω κυτταροπλασματικών συνδετικών πρωτεϊνών (ZO-1,-2,-3, AF6, cingulin). Η ισχύς των συνδέσεων εξαρτάται από την πρωτεϊνική τους σύνθεση. Οι σταθερές συνδέσεις αποτελούν ένα 20% των συνδετικών συμπλεγμάτων ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα [214-217].

Περισσότερες όμως είναι οι συνδέσεις προσκόλλησης (AJs- Adherens Junctions ή zonula adherens). Πρόκειται για συμπλέγματα που δημιουργούνται από πρωτεΐνες της οικογένειας των καντερινών (VE-cadherins) οι οποίες εξαρτώνται από την δράση του ασβεστίου. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $p120$ - κατενινών (catenins) [218-222].

Φλεγμονώδεις μεσολαβητές και ανάμεσά τους οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τα λευκοκύτταρα οδηγούν στην αποσυναρμολόγηση των παραπάνω συνδέσεων του ενδοθηλίου. Οι οκλουδίνες υπόκεινται σε μείωση της έκφρασης και της παρουσίας τους στη μεμβράνη από το οξειδωτικό στρες με συνέπεια την μείωση της ισχύος των σταθερών συνδέσεων [223,224]. Ο ολιγομερισμός της οκλουδίνης

ρυθμίζεται από τον λόγο GSH/GSSG [225], ο οποίος μεταβάλλεται στη φλεγμονή υπέρ της GSSG. Επίσης η τυροσινική φωσφορυλίωση της οκλουδίνης στο C-τελικό άκρο που συνδέεται με την ακτίνη ρυθμίζεται από το οξειδωτικό στρες [226-228].

Στις συνδέσεις προσκόλλησης το οξειδωτικό στρες επάγει την φωσφορυλίωση κατάλοιπων σερίνης/τυροσίνης των VE-cadherin,  $\beta$ -catenin, p120 catenin με την ενεργοποίηση τυροσινικών κινασών (c-Src, PYK2, FAK, PKC), της πρωτεΐνης Rac και του VEGF προκαλώντας αποσυναρμολόγηση [229-233]. Επιπλέον η ενδοκυττάρια παραγωγή 4-HNE από την οξείδωση λιπιδίων της μεμβράνης προκαλεί τροποποίηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις συνδέσεις του ενδοθηλίου [234].

Τέλος φλεγμονώδεις μεσολαβητές και το οξειδωτικό στρες προκαλούν αναδιάταξη του ακτινοσκελετού που διατηρεί την μορφολογική δομή του ενδοθηλιακού κυττάρου [235-237] καθώς επηρεάζεται η ικανότητα πολυμερισμού της ακτίνης και τροποποιείται η δράση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του δικτύου όπως η φιλαμίνη και η  $\alpha$ -ακτινίνη [238-240]. Αλλαγές του κυτταροσκελετού οδηγούν σε αλλαγή της μορφολογίας του κυττάρου, χαλάρωση των συνδέσεων και δημιουργία ρηγμάτων από τα οποία γίνεται εξαγγείωση υγρού και πρωτεϊνών στο διάμεσο χώρο με συνέπεια το οίδημα που χαρακτηρίζει την φλεγμονή.

### **3.6. Σηματοδοτικός ρόλος του οξειδωτικού στρες στη φλεγμονή**

Η διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού του ενδοθηλίου σχετίζεται με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η αύξηση του οδηγεί με διάφορους μηχανισμούς όπως η ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοντουλίνη κίνησης της μυοσίνης (MLCK), η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών PKC $\alpha$  και Rho-A στην αναδιοργάνωση του δικτύου της ακτίνης και την αύξηση της ενδοθηλιακής

διαβατότητας. Φλεγμονώδεις μεσολαβητές αυξάνουν μέσω υποδοχέων την είσοδο του  $\text{Ca}^{2+}$  στο κύτταρο και την διαπερατότητα [241-244].

Η συγκέντρωση του ελεύθερου  $\text{Ca}^{2+}$  είναι σε αμφίδρομη σχέση με την παραγωγή ελεύθερων ριζών οι οποίες προκαλούν την είσοδό του στα κύτταρα με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί αλλά αποδίδονται ενδεχομένως στη δράση των TRPC πρωτεϊνών. Αυτές συμμετέχουν στα κανάλια εισόδου του  $\text{Ca}^{2+}$  και είναι ευαίσθητες στις ελεύθερες ρίζες [245-250].

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ευοδώνει την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσων της μυοσίνης η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της σύσπασης που οδηγεί στην αναδιοργάνωση του ενδοθηλιακού ακτινοσκελετού [251-254].

Οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες της οικογένειας GTPασών και συγκεκριμένα τις υποοικογένειες Rho και Ras, ανάμεσά τους τις RhoA, Rac1, Cdc42 και την Ras GTPase Rap1 που σχετίζονται με την διατήρηση του κυτταρικού φραγμού [255-260].

Στο ενδοθήλιο το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ενεργοποιεί διάφορους ισότυπους των PKCs ενζύμων είτε με οξείδωση ακολουθιών κυστεΐνης στη ρυθμιστική τους περιοχή είτε με φωσφορυλίωση σε άλλες θέσεις [261,262]. Η δράση των PKCs σχετίζεται με αύξηση της διαπερατότητας στο ενδοθήλιο και έχει συνδεθεί με αγγειακές διαταραχές και οίδημα πνευμόνων [254,263-266].

Ακόμη ενισχύεται συνεχώς η άποψη ότι η παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι σημαντική για την διαδικασία της σηματοδότησης μέσω των Toll-υποδοχέων [267-269].

### 3.7. Ελεύθερες ρίζες και ιστική βλάβη

Είναι γνωστό πως τα κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M1) στην περιοχή της φλεγμονής εκλύουν κυτοκίνες (TNFα, IL-1, IL-6) και οξειδωτικούς παράγοντες και η ανεξέλεγκτη δράση τους μπορεί να οδηγήσει σε ιστική βλάβη. Ο κυτταρικός θάνατος επάγεται με δύο τρόπους: α) με την εξωγενή οδό, κατά την οποία ειδικοί υποδοχείς (cell-death receptors), οι TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Fas receptor, συνδέονται με τους παράγοντες TNFα, Fas ligand και TRAIL [270-273] κάτω από την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών και ενεργοποιούν την κασπάση-8 και στη συνέχεια άλλες δραστικές κασπάσες όπως η κασπάση-3 που προκαλεί απόπτωση και κυτταρικό θάνατο [274]. β) Αν τα επίπεδα της ενεργοποιημένης κασπάσης -8 δεν είναι πολύ αυξημένα μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω του Bcl-2 η ενδογενής (εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια) οδός [275] κατά την οποία από τον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών Bax/Bak στην έξω μεμβράνη των μιτοχονδρίων προκαλείται αποδόλωση της μεμβράνης, αύξηση της διαπερατότητας και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cyt-c) και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα [276]. Το κυτόχρωμα c συνδέεται με τον παράγοντα ενεργοποίησης της απόπτωσης (Araf-1), στην συνέχεια με την κασπάση-9 δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα γνωστό σαν αποπτώσωμα (apoptosome) [277], που ενεργοποιεί δραστικές κασπάσες και την κασπάση-3 και προκαλεί κυτταρικό θάνατο.

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και με άλλες οδούς όπως η ενεργοποίηση της JNKινάσης και η οξείδωση του μορίου της καρδιολιπίνης που μεταφέρεται στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και διευκολύνει την διαδικασία [271,272,278-282].

Αντίθετα αν η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών ενδοκυττάρια είναι χαμηλή



ενεργοποιείται ο AP-1 μεταγραφικός παράγοντας [283] και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, ενώ ο TNFR1 ενεργοποιεί τον NF-κΒ που πυροδοτεί την μεταγραφή της σουπεροξειδικής δισμουτάσης η οποία αναστέλλει την περαιτέρω παραγωγή ελεύθερων ριζών παρεμποδίζοντας την απόπτωση [272,278].

Από τα παραπάνω αναδεικνύεται η δομική συνύπαρξη του οξειδωτικού στρες με την φλεγμονή. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις φυσιολογικά σηματοδοτικά μονοπάτια για το κύτταρο ενώ σε υψηλότερες είναι απαραίτητες για την καταστροφή παθογόνων. Αν η δράση τους δεν περιοριστεί από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς θα προκληθεί κυτταρική βλάβη. Η πλήρης κατανόηση της ρύθμισης των υποκείμενων μηχανισμών σε φυσιολογικές συνθήκες και στη φλεγμονή μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη μελλοντικά επιτυχημένων κλινικών εφαρμογών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΜΕΘ**

### **4.1. Το οξειδωτικό στρες στους βαρέως πάσχοντες.**

Αν και η παρουσία του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς της μονάδας εντατικής θεραπείας είχε θεωρηθεί αρχικά ένα επιφανινόμενο της φλεγμονώδους απάντησης φαίνεται σήμερα πως αποτελεί μια κοινή οδό σε απειλητικές για την ζωή καταστάσεις και σε αρκετές μελέτες συσχετίζεται με πολυοργανική ανεπάρκεια, αυξημένη θνητότητα και θνησιμότητα [284-287].

Αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει καταγραφεί σε μια ποικιλία νοσημάτων στη μονάδα εντατικής θεραπείας. Οι Mishra et al. μέτρησαν υψηλότερα επίπεδα MDA και ισοπροστανίων στο πλάσμα σε μεικτό πληθυσμό ασθενών που κατέληξαν σε

σύγκριση με όσους επιβίωσαν [288]. Οι Alonso de Vega et al. συμπέραναν ότι η οξειδοαναγωγική ισοροπία του βαρέως πάσχοντα συσχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου σε ασθενείς με SIRS [285]. Άλλες μελέτες υπογραμμίζουν την σημασία του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση του ARDS [289,290]. Τα επίπεδα των καρβονυλίων, των TBARS και η δραστικότητα της ξανθινικής οξειδάσης του πλάσματος ήταν αυξημένα σε σοβαρά εγκαυματίες ασθενείς και εμφάνιζαν συσχέτιση με κακή κλινική έκβαση [291]. Τα καρβονύλια του πλάσματος και του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος βρέθηκαν αυξημένα σε πολυτραυματίες [292]. Ασθενείς με κρανιεγκεφαλική κάκωση και εγκεφαλική αιμορραγία είχαν χαμηλότερα επίπεδα ασκορβικού οξέως στο πλάσμα που εμφάνιζαν αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση με την νευρολογική εικόνα και την έκταση της βλάβης [293].

Στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς πολλοί παράγοντες μπορούν να συνδυαστούν και να προκαλέσουν μια δραματική αύξηση στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Το πιο κοινό είναι η συστηματική φλεγμονώδης απόκριση που συνδυάζεται συνηθέστερα με την σήψη και στη συνέχεια με ένα ευρύ φάσμα νοσημάτων που την πυροδοτούν, όπως οι επεμβάσεις στην κοιλιακή χώρα, το τραύμα, η παγκρεατίτιδα, το έγκαυμα. Άλλοι παράγοντες που δυνητικά συντελούν είναι η χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου σε αναπνευστική ανεπάρκεια, η βλάβη που προκαλείται σε συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης όπως σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη και στις αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις, η επηρεασμένη νεφρική λειτουργία που οδηγεί σε μειωμένη αποβολή προοξειδωτικών ουσιών, η απώλεια αντιοξειδωτικών στον τρίτο χώρο λόγω αυξημένης τριχοειδικής διαβατότητας, η μειωμένη επαναπρόσληψη και απορρόφηση τους, η υπεργλυκαιμία και τα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών που μπορεί να οφείλονται σε κατανάλωση,

μειωμένη πρόσληψη, απώλειες λόγω αιμοκάθαρσης ή ανακατανομής [294-297].

#### **4.2. Χορήγηση αντιοξειδωτικών**

Στους νοσηλευόμενους στην μονάδα εντατικής θεραπείας έχει παρατηρηθεί μείωση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων, ελαττωμένες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών ουσιών στο πλάσμα και ενδοκυττάρια καθώς και ιχνοστοιχείων και μειωμένη δραστηριότητα ενζυμικών μηχανισμών που αποσκοπούν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών [298]. Τα επίπεδα αντιοξειδωτικών της κυκλοφορίας μειώνονται σημαντικά μετά από φλεγμονή, τραύμα ή χειρουργείο και παραμένουν χαμηλά για αρκετές ημέρες έως εβδομάδες. Όσο βαρύτερο το τραύμα, η φλεγμονή ή η σήψη τόσο μεγαλύτερη φαίνεται να είναι η μείωση των αντιοξειδωτικών [285,299,300].

Η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών στον ασθενή της ΜΕΘ και η ανεπάρκεια αντιρρόπησης της οξειδωτικής προσβολής των ιστών από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οδήγησε στην σκέψη της ενίσχυσης των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του οργανισμού με την εξωγενή χορήγηση αντιοξειδωτικών.

Αρκετές κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί καθώς και μεταanalύσεις έχουν δημοσιευτεί κατά την διάρκεια των τελευταίων χρόνων χωρίς να καταλήγουν σε σαφή και οριστικά συμπεράσματα [301-307].

##### **i. Γλουταμίνη**

Η γλουταμίνη είναι το πιο άφθονο ελεύθερο αμινοξύ στον οργανισμό με περισσότερο από το 50% να επιμερίζεται στον σκελετικό μυ. Ωστόσο τα αποθέματα των μυών εξαντλούνται γρήγορα σε περίπτωση έντονου καταβολισμού όπως η

σήψη, το έγκαυμα, το τραύμα και ενώ αποτελεί μη βασικό αμινοξύ για τον υγιή οργανισμό, δεν ισχύει το ίδιο σε καταστάσεις έντονου και ιδίως παρατεταμένου στρες [298]. Η γλουταμίνη παίζει βασικό ρόλο στην μεταφορά του αζώτου, στην διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, στην σύνθεση νουκλεοτιδίων και αργινίνης, στη φαγοκυτταρική ικανότητα και λειτουργία των ανοσοκυττάρων και την ρυθμιστική ικανότητα νεφρού [308-310]. Ταυτόχρονα δρα σαν αντιοξειδωτικό επειδή αποτελεί πρόδρομη ουσία για την βιοσύνθεση της γλουταθειόνης [298,310]. Η μείωση που παρατηρείται σε καταβολική νόσο, οφείλεται στην αυξημένη κατανάλωση στο σύνολο του οργανισμού και στην σχετικά επηρεασμένη σύνθεσή της στον σκελετικό μυ. Η ανεπάρκεια κάλυψης των αναγκών οδηγεί σε προτεόλυση [311,312]. Μείωση των αποθεμάτων της έχει συνδεθεί με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και αυξημένη θνητότητα [313-315]. Ποσοστό 25-35% των ασθενών της εντατικής θεραπείας εμφανίζουν έλλειψή της άμεσα, κατά την εισαγωγή τους στη μονάδα και ιδιαίτερα οι εγκαυματίες, ενώ σε παρατεταμένη νόσο η έλλειψη είναι σημαντική [314-317].

Σε μια σειρά μελετών έχει διαπιστωθεί πως η ενδοφλέβια χορήγηση γλουταμίνης συνέβαλλε στην πρόληψη των λοιμώξεων, μείωση της διάρκειας του μηχανικού αερισμού, μείωση της πιθανότητας πνευμονίας και μείωση της επίπτωσης βακτηριαιμίας και μυκηταιμίας [317-319]. Ωστόσο η επίδραση του περιορισμού αυτών των επιπλοκών στην διάρκεια παραμονής στην μονάδα εντατικής ή στο νοσοκομείο δεν ήταν ξεκάθαρη [320,321] αν και σε άλλες μελέτες φαίνεται να μειώνει την διάρκεια νοσηλείας στη μονάδα και το νοσοκομείο [319]. Στη σήψη η ενδοφλέβια χορήγησή της έχει βρεθεί να βοηθά στην πρόληψη και θεραπεία της πολυοργανικής ανεπάρκειας [320,322] ενώ επίσης ασκεί προστατευτικό ρόλο

απέναντι στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη βελτιώνοντας τον γλυκαιμικό έλεγχο [323]. Σε επιλεγμένους χειρουργικούς ασθενείς μείωσε τις λοιμώδεις επιπλοκές και την διάρκεια νοσηλείας [324]. Αν και η οδός χορήγησης παραμένει αμφισβητούμενη, η ενδοφλέβια χορήγησή της σε δόση 0.3–0.6 g/kg/ημέρα διπεπτιδίου αλανυλ-γλουταμίνης στους ασθενείς της εντατικής θεραπείας καθιερώθηκε σαν σύσταση βαθμού Α από τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παρεντερικής και Εντερικής διατροφής (ESPEN) [325].

Το 2013 όμως δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μιας μεγάλης καναδικής πολυκεντρικής μελέτης 1200 συμμετεχόντων που αμφισβήτησε την θετική συνεισφορά της ενδοφλέβιας γλουταμίνης διαπιστώνοντας τάση για αύξηση της θνητότητας στις 28 ημέρες και αύξηση της ενδονοσοκομειακής και απώτερης θνητότητας στους 6 μήνες ενώ παράλληλα δεν κατέγραψε κανένα όφελος ως προς την αποφυγή των λοιμώξεων και την πολυοργανική ανεπάρκεια [316]. Η διαφορά της συγκεκριμένης μελέτης από τις προηγούμενες είναι ότι συμπεριέλαβε στο πρωτόκολλο της ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια ή νεφρική ανεπάρκεια άμεσα κατά την εισαγωγή τους ενώ οι ασθενείς αυτοί είχαν αποκλειστεί στις προηγούμενες μελέτες. Δημιουργήθηκαν λοιπόν ερωτηματικά για την προσθήκη της γλουταμίνης πρώιμα στην οξεία φάση της βαριάς νόσου με αποτέλεσμα από αρκετούς να μην συστήνεται η χορήγηση της σε ασθενείς με καταπληξία υπό αγγειοσυσπαστικά και πολυοργανική ανεπάρκεια ενώ φαίνεται πως χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί η βέλτιστη δόση και ο καταλληλότερος χρόνος χορήγησης [319]. Στην αναθεώρηση του 2015, οι συστάσεις των οδηγιών του Καναδά για την διατροφή των βαρέως πασχόντων δεν προτείνουν πλέον την χρήση

της γλουταμίνης σε συνδυασμό με παρεντερική ή εντερική διατροφή εξαιτίας ανεπαρκούς τεκμηρίωσης της ασφάλειας χορήγησής της.

## ii. Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο με αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες [326,327]. Στον ανθρώπινο οργανισμό ενσωματώνεται σε ένα αμινοξύ, την σεληνοκυστεΐνη που είναι βασική για την λειτουργία σεληνοπρωτεϊνών όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της θειορεδοξίνης και η αποϊωδινάση της ιωδοθυρονίνης [328].

Διαταραχή της κινητικής και χαμηλά επίπεδα σελήνιου έχουν αναφερθεί στους βαρέως πάσχοντες [307,329]. Οι Forceville et al. κατέγραψαν χαμηλές συγκεντρώσεις σελήνιου στο πλάσμα ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση που εμφάνιζαν συσχέτιση με αυξημένη θνητότητα και ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας [330]. Οι Stoppe et al. διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα σελήνιου στο ολικό αίμα μειώνονταν σημαντικά κατά την διάρκεια επέμβασης αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Τα χαμηλά επίπεδα στο τέλος του χειρουργείου εμφάνιζαν συσχέτιση με την εμφάνιση μετεγχειρητικής πολυοργανικής ανεπάρκειας [331].

Έχει περιγραφεί πως η χορήγηση σελήνιου βελτιώνει την έκβαση στους ασθενείς της εντατικής επειδή βοηθά στη μείωση των λοιμωδών επιπλοκών και στην πρόληψη πολυοργανικής ανεπάρκειας και ιδιαίτερα στους σηπτικούς ασθενείς [320]. Οι Forceville et al. πραγματοποίησαν μια διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη κατά την οποία χορήγησαν υψηλές δόσεις σελήνιου σε ασθενείς της εντατικής για διάστημα 10 ημερών. Δεν διαπίστωσαν καμία διαφορά σε σχέση με την ομάδα

ελέγχου ως προς την διάρκεια του μηχανικού αερισμού, την απόσυρση των αγγειοσπαστικών, την διάρκεια νοσηλείας στην μονάδα και την θνητότητα [332]. Αντίθετα οι Manzanares et al., διαπίστωσαν ότι υψηλές δόσεις παρεντερικής χορήγησης σελήνιου αποκαθιστούν τα επίπεδα του στον ορό, μεγιστοποιώντας την δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Δεν παρουσιάζουν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες άμεσα αλλά βελτιώνουν τον δείκτη κλινικής βαρύτητας SOFA και μειώνουν την πιθανότητα πρόκλησης ενδονοσοκομειακής πνευμονίας και της πρώιμης πνευμονίας του αναπνευστήρα [329,333].

Οι Valenta et al. σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη 150 ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση/σήψη απέτυχαν να αναδείξουν διαφορές ως προς τους δείκτες κλινικής βαρύτητας, τους δείκτες φλεγμονής, την αντιοξειδωτική άμυνα και την θνητότητα στους ασθενείς που έλαβαν ενδοφλέβια σελήνιο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [334]. Αντίθετα, οι Angstwurm et al. διαπίστωσαν ότι υψηλές δόσεις σελήνιου βελτίωσαν την θνητότητα σε ασθενείς με βαριά σήψη και σηπτική καταπληξία [335].

Στις παραπάνω μελέτες χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις σελήνιου, σε όλες όμως χορηγήθηκε εφάπαξ αρχική δόση που κυμαινόταν από 1000-4000 μg διαφόρων ενώσεων σεληνίου λόγω της θεωρητικά ευεργετικής προοξειδωτικής του δράσης σε πρώιμη χορήγηση [336]. Είναι προφανές πως τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα στους σηπτικούς ασθενείς πρέπει να τεκμηριωθούν σε μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες [337].

### iii. Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο για τον οργανισμό και η διατήρηση της φυσιολογικής ομοιοστασίας του είναι σημαντική για την λειτουργία του ανοσοποιητικού, την ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, την επούλωση τραυμάτων και την αντιοξειδωτική προστασία κυρίως μέσω της δράσης της συνδεδεμένης με χαλκό και ψευδάργυρο-σουπεροξειδικής δισμουτάσης [301].

Χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου έχουν συνδεθεί με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, αυξημένα ποσοστά λοιμώξεων και αυξημένη θνητότητα και θνησιμότητα μετά από λοίμωξη κυρίως σε ηλικιωμένους και ασθενείς με χρόνιες παθήσεις [338]. Σε μία πρόσφατη μελέτη παρατήρησης σε ασθενείς εντατικής θεραπείας τα επίπεδα του ψευδαργύρου στον ορό εμφάνιζαν αντίστροφη συσχέτιση με το δείκτη SOFA και την παρουσία πολυοργανικής ανεπάρκειας [339].

Μια ανάλυση τεσσάρων τυχαιοποιημένων μελετών που αφορούσε σε συμπληρωματική χορήγηση ψευδαργύρου δεν ανέδειξε καμία επίδραση στην θνητότητα αλλά μία τάση για μειωμένη διάρκεια παραμονής στην μονάδα εντατικής θεραπείας [340].

Μεχρι σήμερα δεν υπάρχει σύσταση για καθημερινή χορήγηση ψευδαργύρου στους ασθενείς της εντατικής ούτε δεδομένα για την επιθυμητή δόση και τον τρόπο χορήγησης [338]. Η Αμερικανική Εταιρεία Παρεντερικής και Εντερικής Διατροφής (ASPEN) συστήνει 2.5-5mg/ημερησίως ενώ οι δόσεις είναι μεγαλύτερες για καταβολικούς ασθενείς και σε περιπτώσεις απωλειών από το γαστρεντερικό [341]. Και σε αυτή την περίπτωση εκκρεμεί να αποδειχθεί η ευεργετική δράση της



συμπληρωματικής χορήγησης ψευδαργύρου με μεγάλες τυχαιοποιημένες πολυκεντρικές μελέτες.

#### iv. Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση μέσω μιας ελεύθερης σουλφυδρυλικής ομάδας κυστεΐνης που περιέχει, η οποία αντιδρά με ρίζες υδροξυλίου και περοξυνιτρίτη. Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσής της στο πλάσμα αποτελεί την μεγαλύτερη δεξαμενή θειολών στην κυκλοφορία [342]. Παράλληλα έχει την ικανότητα λόγω της δομής της να δεσμεύει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός που είναι έντονα προοξειδωτικά μειώνοντας την δραστικότητα και την διαθεσιμότητα τους για την αντίδραση Fenton [343-345].

Η υποαλβουμιναιμία είναι συχνή στους ασθενείς της εντατικής και έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνητότητα [346]. Όμως οι μελέτες που ασχολήθηκαν με την χορήγηση αλβουμίνης μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναδείξει σαφή ευεργετικά αποτελέσματα. Η μεγάλη μελέτη SAFE εξέτασε την χρήση αλβουμίνης συγκριτικά με την χορήγηση φυσιολογικού χλωριονατρίου ορού για την αναπλήρωση όγκου κατά την ανάνηψη και δεν διαπίστωσε σημαντικές διαφορές [347]. Άλλες μελέτες κατέγραψαν θετικές δράσεις από την χορήγησή της, ιδιαίτερα στους σηπτικούς ασθενείς [348,349]. Μεταanalύσεις με τελευταία μία της βάσης δεδομένων Cochrane επίσης δεν διαπίστωσαν όφελος [350-352]. Πεδίο διερεύνησης αποτελεί για την ώρα η χορήγηση μεγάλων δόσεων αλβουμίνης σε υπαραχνοειδείς αιμορραγίες και οξέα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά συμβάματα όπου φαίνεται να υπάρχουν πρώιμα ενθαρρυντικά αποτελέσματα [304].

#### v. N-ακετυλκυστεΐνη

Η ακετυλκυστεΐνη είναι το N-ακετυλιωμένο παράγωγο του αμινοξέως L-κυστεΐνη και αποτελεί πρόδρομη ουσία για το σχηματισμό της γλουταθειόνης. Η ομάδα της θειόλης που περιέχει, είναι υπεύθυνη για την άμεση αντιοξειδωτική της δράση καθώς αδρανοποιεί τις ρίζες του υδροξυλίου και του υποχλωριώδους οξέος [353,354]. Η N-ακετυλκυστεΐνη αναγεννά το μονοξειδίο του αζώτου (NO) προκαλώντας αγγειοδιαστολή, ελλατώνει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB και την παραγωγή κυτοκινών όπως της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και του TNFα και αναστέλλει την συσώρευση των αιμοπεταλίων με αύξηση του cGMP [284]. Σαν αντιοξειδωτικό χρησιμοποιείται για την πρόληψη της νεφροπάθειας από τα σκιαγραφικά [355].

Η χρήση της N-ακετυλκυστεΐνης έχει διερευνηθεί αρκετές φορές σε βαρέως πάσχοντες με ALI/ARDS και σήψη με πολυοργανική ανεπάρκεια, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Δεν έχει αποσαφηνιστεί καμία ωφέλεια σε κύριες παραμέτρους όπως η διάρκεια νοσηλείας και η θνητότητα [356-365]. Μάλιστα μια πρόσφατη μετανάλυση καταλήγει πως η καθυστερημένη, μετά το πρώτο 24ωρο χορήγησή της, μπορεί να είναι επιζήμια σε ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση ή σήψη λόγω επηρεασμού του καρδιαγγειακού και πρόκλησης αιμοδυναμικής αστάθειας [366].

#### vi. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή L-ασκορβικό οξύ (L-ascorbic acid) η πιο γνωστή από όλες τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες αποτελεί σημαντική αντιοξειδωτική ουσία χαμηλού μοριακού βάρους στο πλάσμα, που δρα με πολλαπλούς μηχανισμούς

συμπεριλαμβανομένης της ανασύστασης της βιταμίνης Ε στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών [367]. Σε φυσιολογικό pH απαντάται με τη μορφή του μονοφορτισμένου ασκορβικού ανιόντος (ascorbate) που μπορεί να οξειδωθεί σε μία διαδικασία δύο σταδίων σε ασκορβική ρίζα (AFR) ή ημιδεϋδροασκορβικό οξύ και στη συνέχεια σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHAA). Το ασκορβικό εισέρχεται ενδοκυττάρια με τη μεσολάβηση διαβιβαστών όπως οι SVCT1, SVCT2 ενώ το δεϋδροασκορβικό μέσω του μεταφορέα εξόζης GLUT1 όπου ανάγεται από το σύστημα της γλουταθειόνης σε ασκορβικό για να χρησιμοποιηθεί ενδοκυττάρια [368].

Από πειραματικές μελέτες σε ζώα, έχει διαπιστωθεί ότι η χορήγηση ασκορβικού μπορεί να προστατεύσει ή να αποκαταστήσει την μικροκυκλοφορία σε σήψη γιατί μπορεί να εμποδίσει την κατανάλωση και να ευοδώσει την απελευθέρωση NO με πολλαπλούς μηχανισμούς, να περιορίσει την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης και της επαγώμενης συνθετάσης του μονοξειδίου (iNOS) και να καταστείλει την έκφραση του HIF-1 βελτιώνοντας την λειτουργία του ενδοθηλίου [369,370]. Στη σήψη έλλειψη ασκορβικού μπορεί να παρατηρηθεί σε ελλιπή πρόσληψη παρά και την παρεντερική χορήγηση, σε αυξημένη κατανάλωση και σε ελάττωση της ενδοκυττάριας μεταφοράς λόγω δράσης της φλεγμονής στους SVCT1, SVCT2 διαβιβαστές [370]. Χαμηλά επίπεδα ασκορβικού έχουν βρεθεί επίσης μετά από τραύμα και χειρουργικές λοιμώξεις [371].

Σε μια παλαιότερη τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη 216 ασθενών εντατικής διαπιστώθηκε πως η από του στόματος χορήγηση ασκορβικού και βιταμίνης Ε μείωσε την θνητότητα στις 28 ημέρες [372]. Σε μια μεγαλύτερη μελέτη χειρουργικών ασθενών η ενδοφλέβια χορήγηση υψηλής δόσης ασκορβικού

(3gr/ημερησίως) σε συνδυασμό με α-τοκοφερόλη διεντερικά, μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης πολυοργανικής ανεπάρκειας, την διάρκεια του μηχανικού αερισμού και την παραμονή στη μονάδα εντατικής θεραπείας [373]. Μείωση της θνητότητας παρατηρήθηκε και σε εγκαυματίες στους οποίους εγχύθηκε υψηλή δόση ασκορβικού και συνάμα μείωση στην απαιτούμενη ποσότητα των υγρών της ανάνηψης, στο οίδημα και στην εμφάνιση αναπνευστικής ανεπάρκειας [374,375]. Ωστόσο η έγχυση ασκορβικού 2 ώρες πριν από μείζονα χειρουργεία, οδήγησε σε οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος κατά την ισχαιμική φάση του χειρουργείου χωρίς να μπορούν να εκτιμηθούν οι συνέπειες [376].

Καθώς θεωρείται πως με βάση την δοσολογία και την βιοδιαθεσιμότητα επαρκή φαρμακολογικά επίπεδα μπορούν να επιτευχθούν μόνο με ενδοφλέβια χορήγηση υψηλών δόσεων [377], προκύπτουν θέματα ασφάλειας που χρειάζονται διερεύνηση καθώς είναι δυνατό εκτός των άλλων να παρατηρηθεί προοξειδωτική δράση σε αυξημένες δόσεις.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μια μελέτη φάσης Ι σε ασθενείς με σοβαρή σήψη. Η χορήγηση 200mg/kg/24ωρο για τέσσερις ημέρες δεν συνοδεύτηκε από ανεπιθύμητα συμβάματα κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης [378].

#### vii. Βιταμίνη Ε

Οι φυσικές μορφές της βιταμίνης Ε είναι οκτώ, οι α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλη (αΤ, βΤ, γΤ, δΤ) και οι α-, β-, γ-, δ- τοκοτριενόλη (αΤΕ, βΤΕ, γΤΕ, δΤΕ). Δεν συντίθεται από τον ανθρώπινο οργανισμό και λαμβάνεται με την τροφή. Η α-τοκοφερόλη είναι η επικρατούσα μορφή της βιταμίνης Ε στο ανθρώπινο σώμα επειδή εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με την πρωτεΐνη-μεταφορέα α-TTP (α-tocopherol-transfer

protein) στο ήπαρ που την ενσωματώνει στις λιποπρωτεΐνες, για να διοχετευθεί από την συστηματική κυκλοφορία στους ιστούς, ενώ η συγκέντρωση της γ-τοκοφερόλης στο αίμα είναι 5-10 φορές χαμηλότερη [379]. Πρόκειται για λιποδιαλυτή βιταμίνη, που δρά αντιοξειδωτικά μέσω του φαινολικού υδροξυλίου που περιέχει στο δακτύλιο χρωμανόλης και προστατεύει από την υπεροξείδωση τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών και τις λιποπρωτεΐνες [379-381].

Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα έχει βρεθεί μειωμένη στους βαρέως πάσχοντες [382]. Σε όλες τις μέχρι σήμερα μελέτες σε ασθενείς της εντατικής έχει χορηγηθεί διεντερικά σε συνδυασμό με βιταμίνη C και αντιοξειδωτικά με αντικρουόμενα αποτελέσματα [306,316,372,373,383]. Ωστόσο έρευνες για την χρήση της στην πρόληψη και θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου, ιδιαίτερα σε υψηλές δόσεις (>400 IU/day), είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα [384-386].

#### viii. Βιταμίνες του συμπλέγματος B

Οι βιταμίνες του συμπλέγματος B συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και στο μεταβολισμό της γλυκόζης και της ομοκυστεΐνης. Ορισμένες μελέτες αναδεικνύουν μια αντιοξειδωτική δράση κυρίως του φυλλικού, της βιταμίνης B6 και της B12 και σημειώνουν την προοξειδωτική επίδραση των αυξημένων επιπέδων της ομοκυστεΐνης του πλάσματος [306].

Βιταμίνες του συμπλέγματος B έχουν χορηγηθεί per os σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό έμφρακτο. Παρατηρήθηκε μείωση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, της MDA, της ομοκυστεΐνης και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Φαίνεται λοιπόν ότι η χορήγησή τους μπορεί να έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη

δράση μετά το έμφρακτο που δεν αντανakλά όμως και σε κλινική βελτίωση [387,388].

Η έλλειψη της βιταμίνης B1 έχει παρατηρηθεί πρώιμα σε βαρέως πάσχοντες [389] ενώ τα δεδομένα για τα επίπεδα της βιταμίνης B12 στους ασθενείς της εντατικής θεραπείας είναι περιορισμένα. Το 2010 οι Manzanares και Hardy υπενθύμισαν πως η κοβαλαμίνη (B<sub>12</sub>) αποτελεί σημαντικό αντιφλεγμονώδη παράγοντα με διάφορους προτεινόμενους μηχανισμούς [390]. Ανάμεσά τους ο έλεγχος του NF-kB που θα μπορούσε να παρεμποδίζει την συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) και την υπέρμετρη παραγωγή του στη σήψη ενώ οι τρανσκοβαλαμίνες που είναι οι πρωτεΐνες-μεταφορείς της B<sub>12</sub>, σε φαρμακολογικές δόσεις, προστατεύουν το ενδοθήλιο από την υπερομοκυστεϊναιμία και αποκαθιστούν την φαγοκυτταρική ικανότητα. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης B<sub>12</sub> προέρχεται από την διέγερση της συνθετάσης της μεθειονίνης και την αντίδραση με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου ενώ ασκεί παράλληλα προστατευτικό ρόλο για τα αποθέματα της γλουταθειόνης. Συστήνουν λοιπόν περαιτέρω πειραματικές και κλινικές μελέτες που θα καθορίσουν την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και την ιδανική δοσολογία χορήγησης της βιταμίνης B12 στους ασθενείς της εντατικής θεραπείας [390].

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΣΗΨΗ

### 5.1. Εισαγωγή

Προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες σε σηπτικούς ασθενείς έχει διενεργηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν με την χρήση διάφορων βιοδεικτών. Οι περισσότερες μελέτες έχουν τεκμηριώσει υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες στους σηπτικούς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [285,287,288,391-394] τα οποία έχουν συσχετιστεί με πολυοργανική ανεπάρκεια και κακή πρόγνωση [287,391,394-398]. Οι Ogilvie et al. [391] διαπίστωσαν μεγαλύτερες τιμές MDA σε 12 ασθενείς με σηπτική καταπληξία, οι Goode et al. [287] βρήκαν αυξημένα TBARS σε πέντε σηπτικούς με πολυοργανική ανεπάρκεια, η δραστηριότητα της ξανθινικής οξειδάσης βρέθηκε αυξημένη σε 14 σηπτικούς με πολυοργανική ανεπάρκεια από τους Galley et al. [392], οι Strand et al. βρήκαν αυξημένα προϊόντα των DMA σε 16 σηπτικούς [393], οι Alonso de Vega et al. διαπίστωσαν αυξημένη MDA, 4-HNE και προϊόντα DMA σε ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση που σε ορισμένους συνδυαζόταν και με σήψη [285] ενώ οι Mishra V et al. βρήκαν περισσότερο αυξημένη την MDA και τα ισοπροσάνια στους σηπτικούς που απεβίωσαν σε σχέση με όσους επέζησαν [288]. Τα καρβονύλια του πλάσματος και του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος βρέθηκαν αυξημένα σε σοβαρή σήψη από τους Winterbourn et al. [292]. Οι Chuang et al. διαπίστωσαν ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με την κλινική βαρύτητα και είναι πιο αυξημένη σε σοβαρή σήψη [394], και οι Ohya et al. ότι τα επίπεδα νιτροτυροσίνης του πλάσματος σχετίζονται με την πρόγνωση [396]. Επιπρόσθετα, μείωση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των σηπτικών ασθενών έχει περιγραφεί [287,391,395]. Τα επίπεδα των βιταμινών A, E, του σελήνιου, του β-



καροτένιου και του λυκοπένιου βρέθηκαν μειωμένα σε σηπτική καταπληξία [287,391] η συγκέντρωση της βιταμίνης C ήταν χαμηλή σε χειρουργικούς ασθενείς που ανέπτυξαν πολυοργανική ανεπάρκεια [397] και οι Cowley et al. ισχυρίζονται ότι το αντιοξειδωτικό δυναμικό είναι χαμηλό στη σήψη και αδυναμία αποκατάστασής του σχετίζεται με κακή κλινική έκβαση [395].

Πρέπει να τονιστεί όμως ότι στην πλειονότητα των παραπάνω μελετών το ενδιαφέρον χρονικά εστιάζεται κυρίως στο πρώτο 24ωρο της διάγνωσης της νόσου, με συνέπεια να διεξάγεται μία μέτρηση του/των υπό μελέτη βιοδεικτών. Άρα δεν έχει συνυπολογιστεί η μεταβολή και η χρονική διάρκεια του φαινομένου. Επιπλέον, από τα υπάρχοντα δεδομένα έχουν παρατηρηθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα και συμπεράσματα σε μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ταυτόσημοι ή ίδιοι βιοδείκτες [395, 398].

Είναι λογικό να υποθέσει κανείς πως μία μέτρηση δεν αρκεί αλλά αντίθετα απαιτούνται επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στην διάρκεια του σηπτικού επεισοδίου για να παρέχουν πληρέστερη εικόνα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του οργανισμού στη σήψη.

Ακόμη, ο προσδιορισμός των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών βιοδεικτών έχει διενεργηθεί σχεδόν στο σύνολο των μελετών σε πλάσμα ή στον ορό των ασθενών και περιστασιακά σε πλήρες αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά όπως το πλευριτικό, το εγκεφαλονωτιαίο ή ιστούς όπως ο μυϊκός. Οι μετρήσεις στο περιβάλλον των ερυθροκυττάρων είναι εξαιρετικά σπάνιες [399,400].

Πρέπει εδώ να σημειωθεί πως το πλάσμα αλληλεπιδρά ελεύθερα με όλους τους ιστούς και συνεπώς με πολλαπλές και ποικίλες πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών. Αντίθετα το περιβάλλον του ερυθροκυττάρου είναι περισσότερο ελεγχόμενο λόγω

του φραγμού της κυτταρικής του μεμβράνης άρα εμφανίζει συγκριτικό πλεονέκτημα σαν αντικείμενο έρευνας.

Παράλληλα πρόσφατες δημοσιεύσεις τονίζουν πως ο ρόλος και η φυσιολογική σημασία των ερυθροκυττάρων έχουν περαιτέρω διευρυνθεί καθώς, εκτός από την μεταφορά του οξυγόνου, είναι πλέον φανερό πως τα ερυθρά συμμετέχουν στη διατήρηση του επιπέδου των αντιοξειδωτικών της συστηματικής κυκλοφορίας [401].

## **5.2. Σκοπός της μελέτης**

Ο κύριος σκοπός της υποκείμενης μελέτης ήταν να διερευνήσει την διακύμανση του οξειδωτικού στρες σε σηπτικούς ασθενείς νοσηλευόμενους στην μονάδα εντατικής θεραπείας για το χρονικό διάστημα προόδου της σήψης. Δευτερευόντως, να εξετάσει πιθανές συσχετίσεις των υπό προσδιορισμό βιοδεικτών μεταξύ τους, με άλλους δείκτες φλεγμονής, με δείκτες κλινικής βαρύτητας καθώς και με την τελική έκβαση. Το οξειδωτικό στρες προσδιορίστηκε με μετρήσεις βιοδεικτών στο πλάσμα αλλά και στα ερυθροκύτταρα που σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί φαίνεται να είναι περισσότερο ακριβείς.

### 5.3. Πρωτόκολλο της μελέτης

#### 5.3.1. Πληθυσμός

Η μελέτη διενεργήθηκε σε σηπτικούς ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Κλινική Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2010-Ιούλιος 2012.

#### 5.3.2. Σχεδιασμός του πρωτοκόλλου

Η μελέτη σχεδιάστηκε για να συμπεριλάβει ασθενείς που εισήχθησαν στην μονάδα εντατικής θεραπείας με την διάγνωση της σηπτικής καταπληξίας καθώς και ασθενείς με οποιαδήποτε άλλη διάγνωση εισόδου εφόσον παρουσίασαν σηπτική καταπληξία για πρώτη φορά κατά την διάρκεια της νοσηλείας τους στη μονάδα.

Προκειμένου να υπάρξει μια ολοκληρωμένη εκτίμηση του οξειδωτικού προτύπου των σηπτικών ασθενών προσδιορίστηκαν τόσο οξειδωτικοί όσο και αντιοξειδωτικοί βιοδείκτες [402,403]. Ως οξειδωτικοί επιλέχθηκαν: α) βιοδείκτες οξείδωσης λιπιδίων, δηλαδή οι αντιδρώσες-ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και το 8-ισοπροστανίνο (8-iso-PGF<sub>2α</sub>), β) βιοδείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CO), γ) η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) για προσδιορισμό στο πλάσμα, και σαν αντιοξειδωτικοί: α) η ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH,GSSG), β) η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) για να προσδιοριστούν στα ερυθροκύτταρα και γ) η σουπεροξειδική δισμουτάση (CuZnSOD ή SOD1) για προσδιορισμό στο πλάσμα των σηπτικών ασθενών.

Η ένταξη των ασθενών στη μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσα στο πρώτο 24ωρο της διάγνωσης. Όλοι οι προαναφερθέντες βιοδείκτες προσδιορίστηκαν μέσα στο 1<sup>ο</sup> και

στη συνέχεια στο 3°, 5°, 8° εικοσιτετράωρο από την εκδήλωση της σηπτικής καταπληξίας.

Η μελέτη έλαβε την έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου-Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας

### 5.3.3. Κριτήρια επιλογής

Όσοι συμμετείχαν στην μελέτη πληρούσαν τα κριτήρια της σηπτικής καταπληξίας με βάση τον ορισμό της σήψης όπως διατυπώθηκε από τους ACCP/SCCM [404]:

Σηπτική καταπληξία (shock) είναι η σήψη που συνοδεύεται από οξεία αιμοδυναμική κατέρρευση (συστολική αρτηριακή πίεση < 90 mm Hg, μέση αρτηριακή πίεση < 70 mm Hg, ή πτώση της συστολικής πίεσης > 40 mm Hg στους ενήλικες ή περισσότερο από 2 σταθερές αποκλίσεις κάτω από το φυσιολογικό για την ηλικία όριο) η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλο αίτιο, και χαρακτηρίζεται από επίμονη και μη αντιρροπούμενη υπόταση παρά την επαρκή χορήγηση υγρών.

### 5.3.4. Κριτήρια αποκλεισμού

Κριτήρια εξαίρεσης από την συμμετοχή στο πρωτόκολλο αποτέλεσαν τα εξής:

- i) Ηλικία <18 ετών,
- ii) Συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση που δεν οφείλεται σε μικροβιακό παράγοντα,
- iii) Χρόνια αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς,
- iv) Δείκτης σωματικής μάζας BMI < 18 kg/m<sup>2</sup>,

ν) Λήψη αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων διατροφής εντός δύο εβδομάδων από την εισαγωγή στη μελέτη.

### 5.3.5. Διαδικασίες του πρωτοκόλλου

Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν, παρακολουθούνταν σε καθημερινή κλινική βάση ενώ υπήρχε και εργαστηριακή παρακολούθηση, από το χρονικό σημείο της εισαγωγής ή έναρξης της σήψης και στη συνέχεια κατά το 1<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup>, 5<sup>ο</sup>, 8<sup>ο</sup> εικοσιτετράωρο τουλάχιστον.

#### Καταγραφή κλινικών δεδομένων

Κατά την είσοδό του ασθενή στην μονάδα εντατικής θεραπείας με την διάγνωση της σηπτικής καταπληξίας, πραγματοποιούνταν καταγραφή στα πλαίσια του πρωτοκόλλου, ορισμένων δημογραφικών στοιχείων (φύλο, ηλικία, κάπνισμα), του ατομικού αναμνηστικού (σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, κρανιεγκεφαλική κάκωση) και πιθανών αλλεργιών. Ακολουθώς διενεργούνταν ενδελεχής κλινική εξέταση και προσδιορισμός της κλίμακας APACHE II, του δείκτη SOFA και της κατηγορίας της σήψης [405,406].

Εκτός των άλλων, η καταγραφή των κλινικών παραμέτρων περιλάμβανε:

- Την θερμοκρασία
- Την μέγιστη δόση αγγειοσπαστικών
- Τον δείκτη οξυγόνωσης  $PO_2/FiO_2$  και τις παραμέτρους του μηχανικού αερισμού (μοντέλο αερισμού MV, αναπνεόμενος όγκος  $V_T$ , αναπνευστική συχνότητα RR, θετική τελοεκπνευστική πίεση PEEP, στατική ενδοτικότητα  $C_s$ )
- Την χρήση κάθαρσης με αιμοδιαδιήθηση

- Την κλίμακα Γλασκώβης (GCS).

Από τις εργαστηριακές παραμέτρους εκτός από τις τιμές των υπό προσδιορισμό δεικτών πραγματοποιούνταν καταγραφή των:

- αιματοκρίτη,
- λευκών αιμοσφαιρίων,
- αιμοπεταλίων
- χρόνου προθρομβίνης/χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης
- ινωδογόνου
- οξαλοξικής και αλανινικής αμινοτρανσφεράσης
- άμεσης/έμμεσης χολερυθρίνης
- κρεατινίνης
- C-αντιδρώσας πρωτεΐνης
- Καλλιεργείων (αίματος, ούρων, βρογχικών εκκρίσεων, βρογχικού εκπλύματος, εγκεφαλονωτιαίου υγρού, υγρού παροχετεύσεων κλπ)

Η καταγραφή όλων των προαναφερόμενων παραμέτρων συνεχιζόταν σε όλα τα προεπιλεγμένα χρονικά σημεία (1<sup>η</sup> ,3<sup>η</sup> , 5<sup>η</sup> ,8<sup>η</sup> ημέρα παρακολούθησης). Στην περίπτωση που η διάγνωση της σηπτικής καταπληξίας προέκυπτε κατά την διάρκεια της νοσηλείας η καταγραφή παρέμενε αντίστοιχα όμοια.

Διάρκεια παρακολούθησης

Εκτος από τις προκαθορισμένες ημερομηνίες αιμοληψιών και παρακολούθησης, ο χρόνος παρατήρησης ως προς την κλινική έκβαση είχε διάρκεια 28 ημερών.

### 5.3.6. Ορισμοί

Αποδιδόμενη στη σηπτική καταπληξία θνητότητα: χαρακτηρίστηκε κάθε θάνατος που συνέβη στο διάστημα της παρακολούθησης όταν τα χαρακτηριστικά σημεία της σηπτικής καταπληξίας, κλινικά και εργαστηριακά, εξακολουθούσαν να είναι παρόντα και ο θάνατος δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε άλλη αιτία με βάση την κρίση του ιατρικού συμβουλίου της μονάδας.

Θνητότητα στη ΜΕΘ: Θάνατοι που συνέβησαν κατά την διάρκεια της νοσηλείας στην μονάδα εντατικής θεραπείας από οποιαδήποτε αιτία.

Ενδονοσοκομειακή θνητότητα: Θάνατοι που συνέβησαν μετά την έξοδο των ασθενών από την μονάδα κατά την διάρκεια της συνεχιζόμενης παραμονής τους στο νοσοκομείο.

### 5.3.7. Διευκρινίσεις

#### Επιβεβαίωση της διάγνωσης της σήψης ως αιτίας της καταπληξίας

Η διάγνωση της σήψης βασίστηκε σε καλλιέργειες αίματος, τουλάχιστον δύο, μίας από περιφερική φλέβα και δεύτερης από ενδαγγειακό καθετήρα, και/ή σε καλλιέργειες βρογχικών εκκρίσεων, ούρων, περιτοναϊκού ή πλευριτικού υγρού που είχαν ληφθεί ταυτόχρονα με την κλινική υποψία της σήψης και κατά την διάρκειά της, σύμφωνα με την γνώμη ιατρικού συμβουλίου, αποτελούμενου από τους ιατρούς της μονάδας.

#### Χορήγηση αντιοξειδωτικών

Μετά το πρώτο 24ωρο όλοι οι ασθενείς έλαβαν σίτιση διεντερική ή παρεντερική ανάλογα με την κλινική τους κατάσταση και με βάση τις υπολογιζόμενες ημερήσιες

ανάγκες όπως αυτές προσδιορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της ESPEN για βαρέως πάσχοντες [407,408]. Στους ασθενείς που έλαβαν παρεντερική διατροφή διενεργούνταν συμπληρωματική χορήγηση 400mg διπεπτιδίου αλανυλ-γλουταμίνης ημερησίως, ενδοφλεβίως, σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες. Μετάβαση από παρεντερική σε εντερική σίτιση ήταν εφικτή εφόσον το επέτρεπε η κλινική κατάσταση του ασθενή και εξασφαλιζόταν η θερμιδική του κάλυψη. Για το λόγο αυτό ήταν δυνατή η συγχορήγηση μείγματος εντερικής και παρεντερικής διατροφής. Δεν χορηγήθηκαν συμπληρωματικά αντιοξειδωτικά σκευάσματα.

#### 5.3.8. Συλλογή των δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με την παρακάτω διαδικασία:

Σε κάθε ασθενή πραγματοποιήθηκε λήψη 15ml αρτηριακού αίματος με άσηπτες συνθήκες διαμέσου ενός ενδοφλέβιου αρτηριακού καθετήρα που είχε ήδη τοποθετηθεί κατά την εισαγωγή του στο τμήμα. Το αίμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon ο οποίος περιείχε 200μl αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέως EDTA 7,5%. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 1370g για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο πλάσμα κατανεμήθηκε σε σωλήνες erpendorf των 2 ml και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την τελική επεξεργασία προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών στο πλάσμα.

Για την παρασκευή του αιμόλυματος, όπου έγινε ο προσδιορισμός των ερυθροκυτταρικών βιοδεικτών, προστέθηκε απιονισμένο νερό στα εναπομείναντα ερυθροκύτταρα του σωλήνα falcon σε αναλογία 1:1 v/v. Ακολούθησε βίαιη ανακίνηση για να προκληθεί θραύση των ερυθρών και φυγοκέντρωση στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο αποτέλεσε το αιμόλυμα που απομονώθηκε



προσεκτικά από το ίζημα των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, το οποίο μεταφέρθηκε σε σωλήνες errendorf και αποθηκεύτηκε στους -80° C.

#### 5.4. Επεξεργασία δειγμάτων και προσδιορισμός βιοδεικτών

Για τους βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν με μη εμπορικές εργαστηριακές μεθόδους, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

##### Μέτρηση ουσιών-αντιδρώντων με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) :

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος των Keles et al. [409]. Σαν αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν υδροχλωρικό-τριυδροξυμεθυλαμινομεθάνιο (Tris-HCl), διάλυμα θειικού νατρίου-θειοβαρβιτουρικού οξέως και διάλυμα τριχλωροοξεικού οξέως (TCA) 35% και 70%.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προστίθενται 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προστίθενται 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και ακολουθεί ανάδευση. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 1 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – TBA και επώαση στους 95 °C για 45 min σε υδατόλουτρο. Κατόπιν, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε πάγο για να κρυώσουν για 5 λεπτά. Προστίθεται 1 mL TCA 70% και ακολουθεί ανάδευση. Μεταφέρεται 1 mL σε φιαλίδια errendorf και φυγοκεντρείται στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 λεπτά. Τέλος, μεταφέρονται με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 530 nm στο φασματοφωτόμετρο.

Υπολογίζεται η συγκέντρωση των TBARS:  $C \text{ (}\mu\text{mol/L)} = (\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$ , όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 /

100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεΰδης (MDA) που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με  $10^{-6}$  με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε  $\mu\text{mol/L}$  [410].

#### Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CO):

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. [411]. Σαν αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα HCL 2.5 N, διάλυμα 2,4-δινιτριφαινυλδραζίνης DNPH 14 Mm και διάλυμα ουρίας 5M (pH 2.3). Σε 50  $\mu\text{L}$  πλάσματος προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  20% TCA σε erpendorfs και ακολουθεί ανάδευση σε vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του). Τα 50  $\mu\text{L}$  20% TCA προστίθενται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Επωάζονται σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούνται στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο. Κατόπιν προστίθεται στο ίζημα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά, διαλύεται με πιπέτα το ίζημα, αναδεύονται τα δείγματα και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο μίας ώρας, γίνεται φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 mL από διάλυμα 10% TCA, γίνεται ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), τα δείγματα τοποθετούνται σε vortex και φυγοκεντρούνται στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

Προστίθεται 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), γίνεται ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρονται με πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση στα 375 nm.

Υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων:  $C \text{ (nmol/mL)} = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$ . Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι  $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$ . Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000  $\mu\text{L}$  στην κυψελίδα /50  $\mu\text{L}$  δείγματος) [410].

#### Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC):

Στη συγκεκριμένη μέθοδο η TAC του ορού υπολογίζεται με την χρήση του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα ( $\text{DPPH}^{\bullet}$ ) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz [412]. Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι διάλυμα φωσφορικού νατρίου και καλίου ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM, διάλυμα DPPH 0.1mM και ασκορβικό οξύ 10 mM. Ακολουθεί διαδοχική σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων (Πίνακας 3, Παράρτημα). Ανακινούνται τα σωληνάρια μερικές φορές και επωάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα  $\text{DPPH}^{\bullet}$  μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 20000 g, στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρονται 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράται η

απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

% Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού x 100

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = [(% Abs μείωση / 100) x 50 x 50] / 1000 [410].

#### Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH):

Για τη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης απαιτείται καθαρισμός του αιμολύματος. Έτσι σε 500μl αιμολύματος προστέθηκαν 500μl 5% TCA σε σωλήνες erpendorf και ακολούθησε ανακίνηση σε vortex. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 28620g για 5 λεπτά στους 5°C . Έγινε συλλογή του υπερκείμενου και προσθήκη 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA και ανακίνηση σε vortex. Μετά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C. Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα erpendorfs και συντηρήθηκε στους -20° C.

Ο προσδιορισμός της GSH βασίζεται στην οξείδωση της από το διθειοδυονιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και το προϊόν της αντίδρασης σημειώνει απορρόφηση στα 412nm [413]. Η σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων είναι ορατές στον Πίνακα 4 (Παράρτημα).

Αναδεύονται τα σωληνάρια erpendorf και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρεται το

περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση στα 412 nm.

Η δραστικότητα της GSH υπολογίζεται ως εξής:  $GSH (mmol/L) = (Abs \text{ δείγματος} - \Delta Abs \text{ τυφλού} / 13.6) \times 262.6$ , όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010  $\mu L$ ) με τον όγκο του αιμολύματος (20  $\mu L$ ) ( $1010 / 20 = 50.5$ ), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογιστεί η 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με  $2 \times 1.3$  για να συνυπολογιστεί η πρώτη (500  $\mu L$  αιμολ. / 500  $\mu L$  5% TCA) και η δεύτερη αραίωση (390  $\mu L$  / 300  $\mu L$ ) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με  $10 \times 2$ , μετατρέπεται σε g/L και ταυτόχρονα συνυπολογίζεται η 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι προκύπτει η συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης ( $GSH \text{ mmol} / g \text{ Hb}$ ) [410].

#### Μέτρηση οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG):

Ρύθμιση του pH του αιμολύματος στο 7.0-7.5. Σε 50  $\mu L$  αιμολύματος, προστίθενται σταδιακά σε ποσότητες 1-2  $\mu L$  κάθε φορά 1M NaOH μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.0-7.5. Κάθε φορά που προστίθεται NaOH, ακολουθεί ανάδευση και έλεγχος του pH με χαρτί μέτρησης pH, το οποίο πρέπει να πάρει ένα πρασινωπό χρώμα σύμφωνα με την κλίμακα που βρίσκεται πάνω στη συσκευασία του. Συνήθως, μια

ποσότητα 4-8  $\mu\text{L}$  από το  $\text{NaOH}$  1M είναι αυτή που απαιτείται για να φτάσει το pH στην τιμή 7.0-7.5.

Κατόπιν, προστίθενται 1  $\mu\text{L}$  2-vinyl pyridine και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Το 2-vinylpyridine εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να παρεμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται ανάδευση κάθε 30 λεπτά και μετά η συνέχεια.

#### Αντιδραστήρια

$\text{NaOH}$  1M (MB: 40) Διαλύονται 4 g  $\text{NaOH}$  σε 100 mL νερού.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού: Phosphate Buffer (143 mM Na-P, 6.3 mM EDTA, pH 7,5)

MB ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 177.99, MB ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ): 156.01, MB (EDTA): 372.24

10.18 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /400 mL  $\text{H}_2\text{O}$

1.67 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /75 mL  $\text{H}_2\text{O}$

Για να παραχθεί 475 mL phosphate buffer, σε 400 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (143 mM) προστίθενται 75 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (143 mM). Το pH πρέπει να είναι περίπου στο 7.5. Μετά διαλύεται εκεί 1.11 g EDTA. Το pH θα πρέπει να μειωθεί στο 7,35. Ανεβαίνει στο 7.5 (τελική τιμή) με  $\text{NaOH}$ .

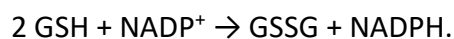
Διάλυμα GSSG 10  $\mu\text{mol/L}$  (MB: 612.6)

Ζυγίζονται 0.0061 g σκόνης GSSG και διαλύονται σε 10 mL ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα. Αραιώνονται 100 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος της GSSG να είναι 10  $\mu\text{mol/L}$  και καλύπτεται το

ποτήρι ζέσεως μέσα στο οποίο βρίσκεται το διάλυμα με αλουμινόχαρτο επειδή είναι φωτοευαίσθητο ώστε να αποφευχθεί η φωτόλυση.

NADPH 3 mM (MB: 833,4)

Διαλύεται 0.0025 g NADPH σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο Errendorf και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο. Η προσθήκη του NADPH χρησιμεύει στην αναγωγή του DTNB από την GSH, προκαλώντας την δημιουργία χρώματος. Η παρακάτω αντίδραση δείχνει τον τρόπο δράσης της NADPH.



DTNB 10 mM (MB:396.3)

Διαλύονται 0.04 g DTNB σε 10 mL φωσφορικού διαλύματος.

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων φαίνεται στον Πίνακα 5 (Παράρτημα).

Αναδεύονται τα errendorf και επωάζονται για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρεται το περιεχόμενό τους σε μία πλαστική κυψελίδα. Προστίθεται 1  $\mu\text{L}$  αναγωγάσης της γλουταθειόνης, ανακινώνται 2-3 φορές και μετράται η απορρόφηση στα 412 nm για 70 δευτερόλεπτα. Η GSSG μετατρέπεται σε GSH μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η αύξηση στην απορρόφηση κατά τη διάρκεια των 70 δευτερολέπτων οφείλεται στην αντίδραση μεταξύ της GSSG και του ενζύμου.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της GSSG (mmol/L) =  $[(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta A_{\text{τυφλού}}) \times 0,75] / \Delta A_{\text{πρότυπου}} - \Delta A_{\text{τυφλού}}] \times 936] / 2/1000$ , όπου το 936 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000  $\mu\text{L}$ ) προς τον όγκο του αιμολύματος (5  $\mu\text{L}$ ) (1000 / 5 = 200), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογιστεί η 1:1 αραίωση

που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με  $2 \times 1.3$  για να συνυπολογιστεί η πρώτη (500  $\mu\text{L}$  αιμολ. / 500  $\mu\text{L}$  5% TCA) και η δεύτερη αραίωση (390  $\mu\text{L}$  / 300  $\mu\text{L}$  ή 260  $\mu\text{L}$  / 200  $\mu\text{L}$ ) που έγιναν από το TCA 5%, πολλαπλασιάζοντας με 0.9 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση από το NaOH και το 2-vinyl pyridine στη διόρθωση του pH. Ακολούθως διαιρείται με 2 για να συνυπολογιστεί η στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ( $2 \text{ GSH} \rightarrow 1 \text{ GSSG}$ ) και διαιρείται με 1000 για να μετατραπούν τα  $\mu\text{L}$  σε mmol. Το 0,75 είναι η συγκέντρωση του πρότυπου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSSG εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη όπως έχει ήδη προαναφερθεί [410].

#### Μέτρηση καταλάσης:

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al. [414]. Οι ποσότητες των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται φαίνονται στον Πίνακα 6 (Παράρτημα).

Γίνεται ανάδευση σε vortex και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Μεταφέρεται το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες φως (UV). Προστίθενται 5  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα, ανακινείται τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράται η απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται από τον τύπο :  $\Delta c \text{ (U/mg Hb)} = (\Delta \text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$ .

Όπου το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000  $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του αιμολύματος (4  $\mu\text{L}$ ) ( $3000 / 4 = 750$ ), το 10



προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη όπως έχει προαναφερθεί [410].

#### Μέτρηση ισοπροστανίου (8-isoPGF<sub>2α</sub>) και σουπεροξειδικής δισμουτάσης (CuZnSOD):

Για την μέτρηση των συγκεντρώσεων του 8-isoPGF<sub>2α</sub> και της CuZnSOD χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά kit και ο προσδιορισμός τους έγινε με βάση τις περιεχόμενες οδηγίες. Για τον προσδιορισμό του 8-isoPGF<sub>2α</sub> χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο και η μέθοδος ELISA της εταιρείας Cayman Chemical Company, 1180 East Ellsworth Road, Ann Arbor, Michigan 48108, USA.

Για τον προσδιορισμό της CuZnSOD χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο και η μέθοδος ELISA της εταιρείας Bender MedSystems του ομίλου eBioscience COMPANY, 10255 Science Center Drive, San Diego, CA 92121, USA.

#### **5.5. Στατιστική ανάλυση.**

Το τεστ των Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας των κατανομών. Το κριτήριο t για ανεξάρτητα δείγματα (*unpaired t-test*) σε παραμετρικές ή το Mann-Whitney U-test σε μη παραμετρικές κατανομές, χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των δύο ομάδων. Το κριτήριο Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για τις ποιοτικές μεταβλητές. Για τη μελέτη της μεταβολής των βιοδεικτών και τις συγκρίσεις στις δύο ομάδες κατά την πρόοδο της σήψης, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης δύο κατευθύνσεων (*two-way analysis of variance*). Για τις post-hoc αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Bonferroni. Η μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ των

μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τους συντελεστές συσχέτισης Pearson για τις παραμετρικές και Spearman για τις μη παραμετρικές κατανομές. Τα δεδομένα εκφράστηκαν σαν μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση ή σαν μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα όπου ήταν αναγκαίο. Τιμή  $p$  ίση ή μικρότερη του 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 5.0. (*GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA*).

## 5.6. Αποτελέσματα

Είκοσι υποψήφιοι εντάχτηκαν στο πρωτόκολλο της μελέτης. Από αυτούς οι δύο δεν πληρούσαν όλες τις προϋποθέσεις συμμετοχής και ένας αποκλείστηκε λόγω τεχνικών σφαλμάτων κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Τελικά 17 ασθενείς θεωρήθηκαν κατάλληλοι και είναι αυτοί που αξιολογήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες α) στους αποβιώσαντες ( $n=10$ ) δηλαδή σε όσους κατέληξαν μέσα στην διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και β) στους επιβιώσαντες ( $n=7$ ), δηλαδή σε όσους ανένηψαν από τη σηπτική καταπληξία και παρέμειναν ζωντανοί έως το τέλος του χρονικού διαστήματος παρακολούθησης, έως την 28<sup>η</sup> μέρα.

Οι έξι ασθενείς της πρώτης ομάδας κατέληξαν πριν ολοκληρώσουν την τέταρτη μέτρηση-χρονικό σημείο (θάνατοι αποδιδόμενοι στην καταπληξία) ενώ οι υπόλοιποι στο επόμενο διάστημα.

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών των δύο ομάδων περιγράφονται στον Πίνακα 7.

	Αποβιώσαντες	Επιβιώσαντες	τιμή p
	n = 10	n = 7	
Ηλικία <sup>a</sup>	58.0 ± 13.3	53.5 ± 16.8	p = ns
Φύλο(άρρεν/θήλυ)	6 / 4	5 / 2	p= ns
APACHE II score <sup>a,b</sup>	19.9 ± 4.97	11.5 ± 5.4	p= 0.005
SOPA score την ημέρα 1 <sup>a,b</sup>	9.80 ± 3.0	8.7 ± 1.7	p = ns
<b>Εστία λοίμωξης</b>			
Πνευμονία	2	4	
Βακτηριαμία	4	1	
Ουρολοίμωξη	0	1	
Περιτονίτις	4	1	
ΚΝΣ <sup>c</sup>	0	0	
<b>Συνυπάρχουσες νόσοι</b>			
ΧΝΑ <sup>d</sup> χωρίς αιμοκάθαρση	0	0	
Ηπατική ανεπάρκεια	0	0	
Σακχ.διαβήτης	2	2	
ΧΑΠ <sup>e</sup>	0	0	
Κρανιεγκεφαλική κάκωση	0	0	
Λήψη κορτικοειδών	0	1	
Μηχ.αερισμός <sup>g</sup>	10	7	
ALI/ARDS <sup>g,h</sup>	2/ 7	2/ 5	p=ns
CRP <sup>a,g,i</sup>	27.6± 18.5	20.3± 3.1	p=ns
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων <sup>a, g</sup>	10.3(5.8/48.3) <sup>j</sup>	14.3±4.69	p=ns
Ενδονοσοκομειακή θνητότητα	100%	43% (3/7)	
Θνητότητα στη ΜΕΘ	100%	28% (2/7)	
Θάνατοι αποδιδόμενοι στην καταπληξία	6/10	0	

**Πίνακας 7.** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

<sup>a</sup>Ηλικία, APACHE II, SOFA, CRP, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων: οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. <sup>b</sup>Κλίμακα APACHE II, δείκτης SOFA χωρίς νευρολογική εκτίμηση (ασθενείς διασωληνωμένοι σε καταστολή). <sup>c</sup>ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα. <sup>d</sup>ΧΝΑ: χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. <sup>e</sup>ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. <sup>g</sup>Μηχ.αερισμός, ALI/ARDS, CRP, αριθμός λευκών στο χρονικό σημείο 1. <sup>h</sup>ALI/ARDS: οξεία πνευμονική θλάβη/ οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων. <sup>i</sup>CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. <sup>j</sup>: οι τιμές εκφράζονται σαν διάμεσος±τεταρτημόρια.

Η μέση ηλικία ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες. Το άθροισμα της κλίμακας APACHE II ήταν  $19.9 \pm 4.97$  στους αποβιώσαντες και  $11.5 \pm 5.4$  στους επιβιώσαντες χωρίς να συμπεριλαμβάνεται στην τιμή η εκτίμηση της κλίμακας Γλασκώβης (λήψη κατασταλτικών). Υπήρχε λοιπόν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ( $p=0.005$ ) ενώ αντίθετα ο δείκτης SOFA δεν εμφάνιζε σημαντική διαφορά μεταξύ τους, με τιμές  $9.80 \pm 3.0$  και  $8.7 \pm 1.7$  αντίστοιχα. Ο αριθμός των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη ήταν ίδιος στις δύο ομάδες ενώ το αίτιο της νοσηλείας στην μονάδα ήταν κυρίως ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, πρωτοπαθείς μικροβιαίμιες και σε μικρότερο αριθμό λοιμώξεις του αναπνευστικού για την ομάδα των αποβιωσάντων ενώ για τους επιβιώσαντες οι λοιμώξεις του αναπνευστικού αποτελούσαν την συχνότερη αιτία. Όλοι οι ασθενείς ήταν μηχανικά αεριζόμενοι. Επτά από τους μη επιβιώσαντες και πέντε από τους επιβιώσαντες παρουσίασαν οξεία πνευμονική βλάβη/σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων ( $PO_2/FiO_2 < 200$ ), ( $p=ns$ ). Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες κατά το χρονικό σημείο της διάγνωσής της. Η θνητότητα εντός της νοσηλείας στην μονάδα εντατικής θεραπείας ήταν 28% και 43% η ενδονοσοκομειακή θνητότητα για την ομάδα των επιβιωσάντων ενώ για τους αποβιώσαντες οι έξι από τους δέκα κατέληξαν εξαιτίας της σηπτικής καταπληξίας.

Οι τιμές όλων των βιοδεικτών για τις δύο ομάδες κατά το πρώτο χρονικό σημείο-μέτρηση διακρίνονται στον Πίνακα 8.

	Αποβιώσαντες (n = 10)	Επιζώντες (n = 7)	τιμή p
GSH <sup>b</sup>	2.37±1.05 <sup>a</sup>	2.88±0.68 <sup>a</sup>	p = 0.276
Catalase <sup>c</sup>	166.4±40.2	238.8±51.5	p = 0.005
GSSG <sup>d</sup>	0.49 ± 0.20	0.73 ± 0.31	p = 0.072
GSH/GSSG	5.43 ± 3.37	4.63 ± 2.02	p = 0.584
TAC <sup>e</sup>	0.68 ± 0.20	0.67 ± 0.14	p = 0.933
TBARS <sup>f</sup>	9.35 ± 4.85	7.84 ± 2.82	p = 0.473
Carbonyls <sup>g</sup>	0.48 ± 0.16	0.32 ± 0.09	p = 0.036
8-isoPGF <sub>2α</sub> <sup>h</sup>	57.7 ± 42.8	60.1 ± 40.3	p = 0.417
CuZnSOD <sup>i</sup>	3.02 ± 4.37	1.30 ± 0.34	p = 0.962

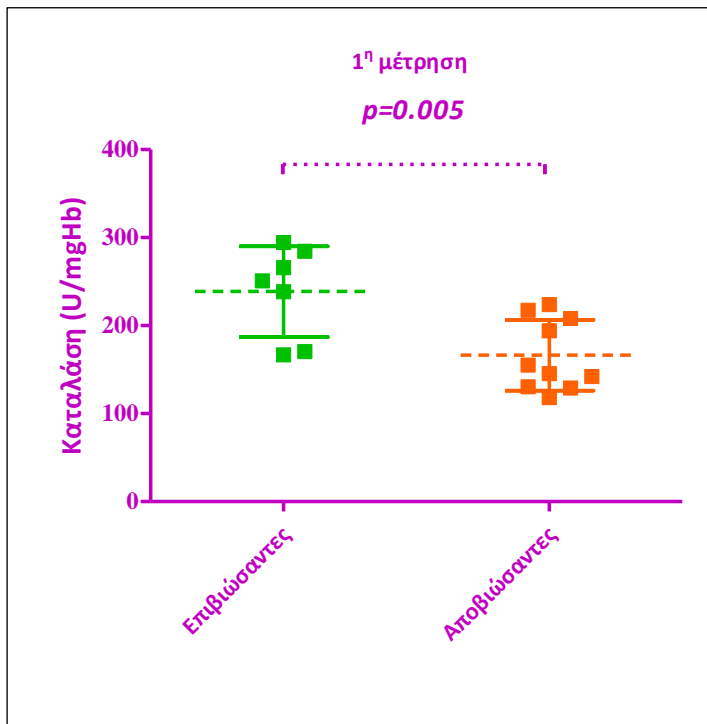
**Πίνακας 8.** Μέση τιμή όλων των βιοδεικτών στις δύο ομάδες κατά την διάγνωση της καταπληξίας. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας πραγματοποιήθηκε με το κριτήριο t για ανεξάρτητα δείγματα.

<sup>a</sup>Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. <sup>b</sup>GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη; <sup>c</sup>Catalase: καταλάση; <sup>d</sup>GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη; <sup>e</sup>TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα; <sup>f</sup>TBARS: ουσίες-αντιδρώσες με το θειοβαρβιτουρικόξύ; <sup>g</sup>Carbonyls: καρβονύλια; <sup>h</sup>8-isoPGF<sub>2α</sub>: ισοπροστάδιο; <sup>i</sup>CuZnSOD: σουπεροξειδική δισμουτάση.

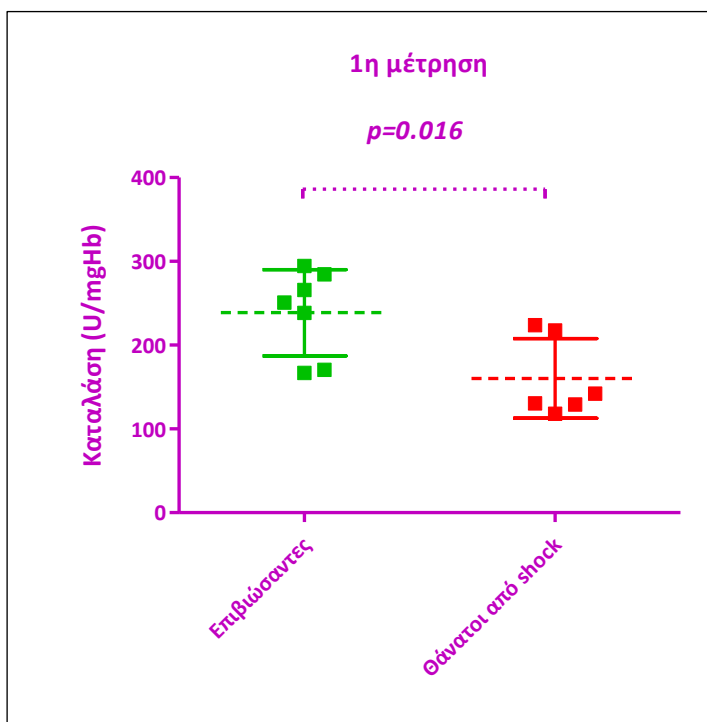
Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την δραστικότητα της καταλάσης και ως προς τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στις δύο ομάδες (p = 0.005 και p = 0.036 αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, η δραστικότητα της καταλάσης ήταν υψηλότερη στους επιβιώσαντες 238.8±51.5 συγκριτικά με όσους κατέληξαν 166.4±40.2, p = 0.005, ενώ η τιμή των καρβονυλίων ήταν υψηλότερη στους αποβιώσαντες 0.48 ± 0.16 σε σχέση με όσους επιβίωσαν 0.32 ± 0.09, p = 0.036 (Γράφημα 1).

Αντίστοιχα, οι τιμές στην υποομάδα αυτών που κατέληξαν εξαιτίας της καταπληξίας ήταν  $160.2 \pm 47.4$ ,  $p = 0.016$ , για την καταλάση και  $0.51 \pm 0.12$ ,  $p = 0.009$  για τα καρβονύλια (Γρ. 1γ, 1δ).

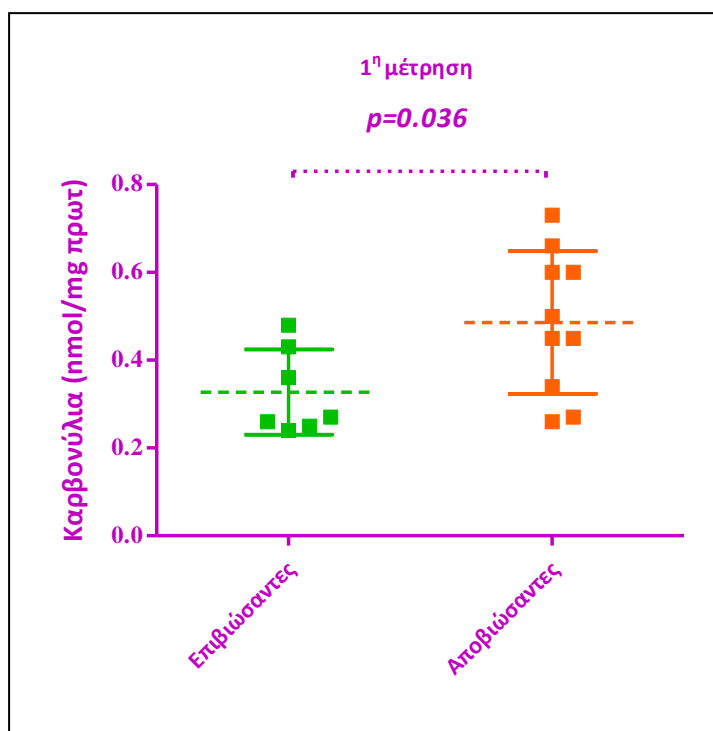
**Γράφημα 1.**



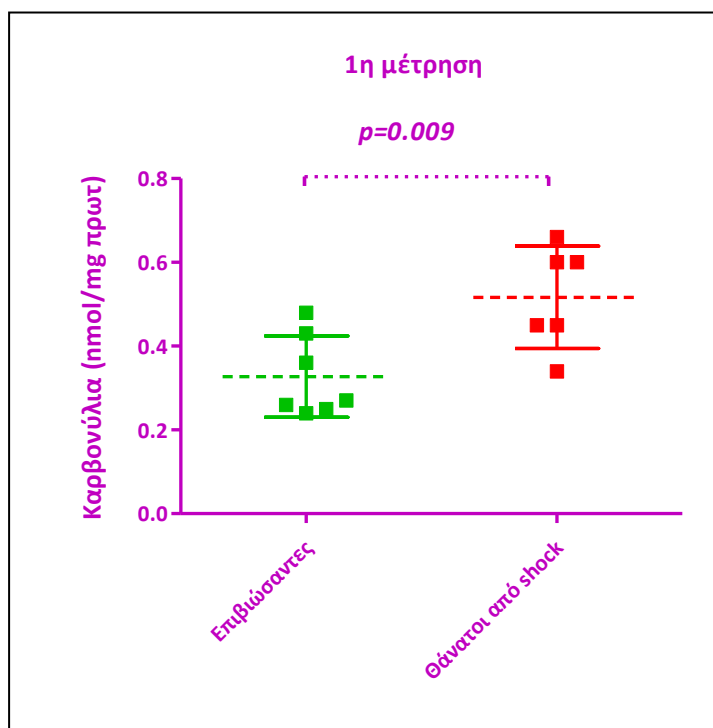
**1α.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών της καταλάσης στις δύο ομάδες στο χρονικό σημείο 1. Τα τετράγωνα απεικονίζουν τις τιμές εντός των ομάδων και τα κάθετα βέλη τα όρια των σταθερών αποκλίσεων ( $\pm sd$ ). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή (*mean*) για την κάθε ομάδα.



**1β.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών της καταλάσης στην υποομάδα όσων κατέληξαν εξαιτίας της καταπληξίας και των επιζώντων στο χρονικό σημείο 1. Τα τετράγωνα απεικονίζουν τις τιμές εντός των ομάδων και τα κάθετα βέλη τα όρια των σταθερών αποκλίσεων ( $\pm sd$ ). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή (*mean*) για την κάθε ομάδα.



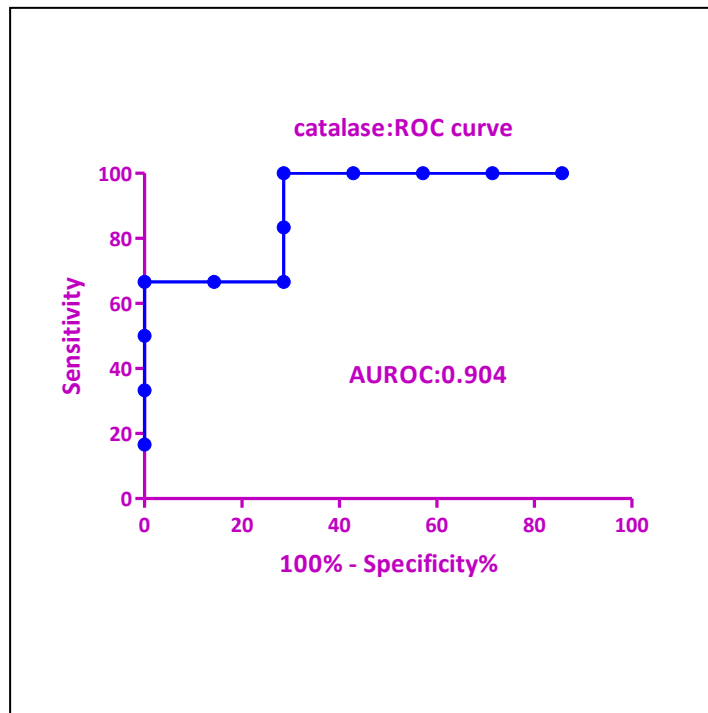
**1γ.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών των καρβονυλίων στις δύο ομάδες στο χρονικό σημείο 1. Τα τετράγωνα απεικονίζουν τις τιμές εντός των ομάδων και τα κάθετα βέλη τα όρια των σταθερών αποκλίσεων ( $\pm sd$ ). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή (mean) για την κάθε ομάδα.



**1δ.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών των καρβονυλίων στην υποομάδα όσων κατέληξαν εξαιτίας της καταπληξίας και των επιζώντων στο χρονικό σημείο 1. Τα τετράγωνα απεικονίζουν τις τιμές εντός των ομάδων και τα κάθετα βέλη τα όρια των σταθερών αποκλίσεων ( $\pm sd$ ). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή (mean) για την κάθε ομάδα.

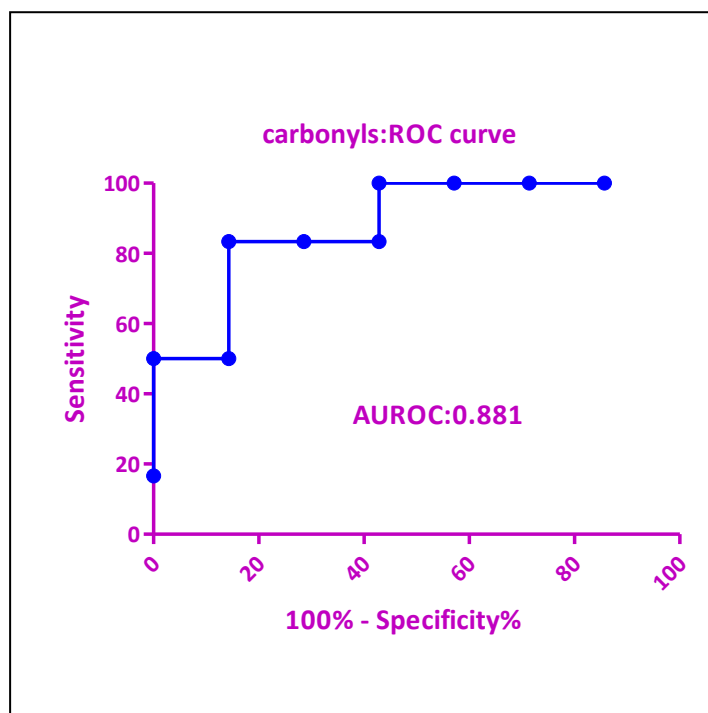
Οι καμπύλες ROC (Receiver Operator Characteristic curves) για τον έλεγχο της ακρίβειας της καταλάσης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων να διακρίνουν στην έναρξη όσους θα καταλήξουν εξαιτίας της καταπληξίας εμφάνισαν AUROC (area under curve) 0.904 και 0.881 αντίστοιχα.

## Γράφημα 2.



**2α.** Καμπύλη ROC που αναδεικνύει την ακρίβεια μέτρησης της καταλάσης στο χρονικό σημείο 1 για την ανίχνευση όσων θα καταλήξουν εξαιτίας της καταπληξίας.

AUROC: 0.904,  $p = 0.015$ .



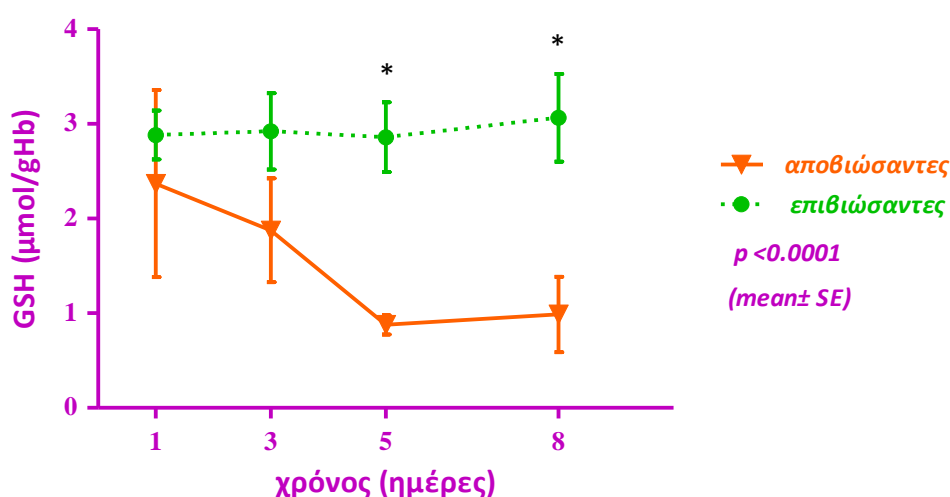
**2β.** Καμπύλη ROC που αναδεικνύει την ακρίβεια μέτρησης των καρβονυλίων στο χρονικό σημείο 1 για την ανίχνευση όσων θα καταλήξουν εξαιτίας της καταπληξίας.

AUROC: 0.881,  $p = 0.022$ .



Η σύγκριση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των βιοδεικτών κατά την διάρκεια του σηπτικού επεισοδίου κατέληξε στις παρακάτω στατιστικά σημαντικές διαφορές.

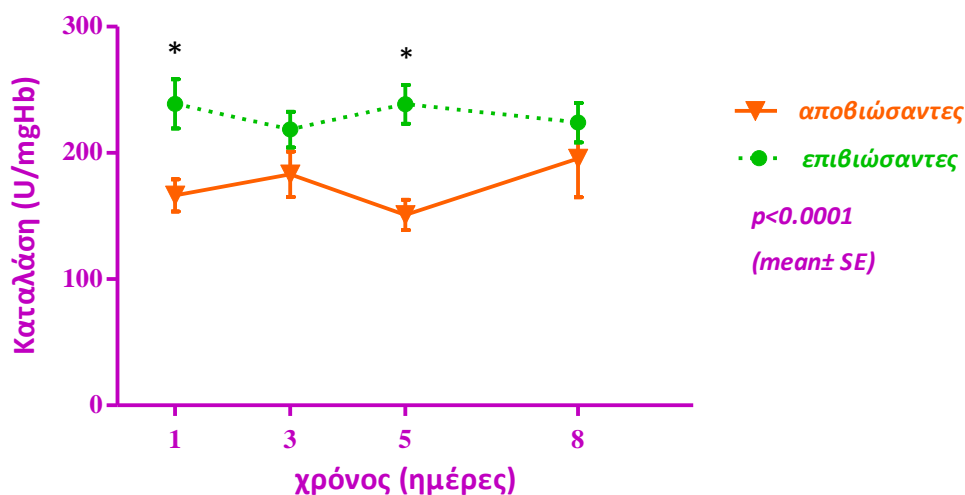
Οι τιμές της ανηγμένης γλουταθειόνης διέφεραν στις δύο ομάδες με τιμή  $p < 0.0001$  (Γρ.3).



**Γράφημα 3.** Απεικόνιση μέσω των όρων των τιμών της ανηγμένης γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν mean ± se (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα).  $P$  στατιστικά σημαντικό  $< 0.05$ . Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο.

Η GSH παρουσίασε μία φθίνουσα πορεία στη διάρκεια του χρόνου παρακολούθησης για την ομάδα των αποβιωσάντων. Από την post-hoc ανάλυση διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες στο τρίτο και τέταρτο χρονικό σημείο με τιμή  $p < 0.05$  και  $p < 0.01$  αντίστοιχα.

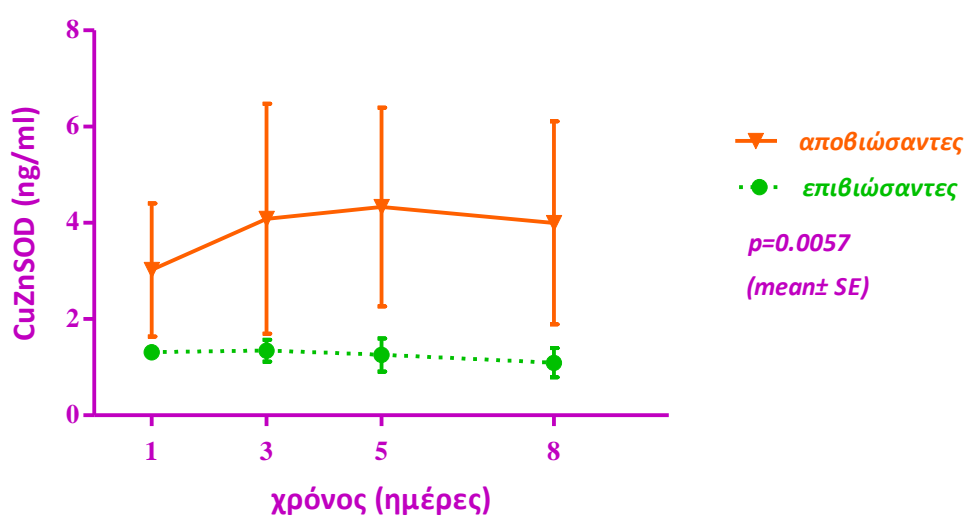
Η δραστηριότητα της καταλάσης διέφερε επίσης σημαντικά με τιμή  $p < 0.0001$  ανάμεσα στις δύο ομάδες (two-way analysis of variance) (Γρ. 4).



**Γράφημα 4.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν mean $\pm$ se (μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα).  $P$  στατιστικά σημαντικό  $<0.05$ . Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο.

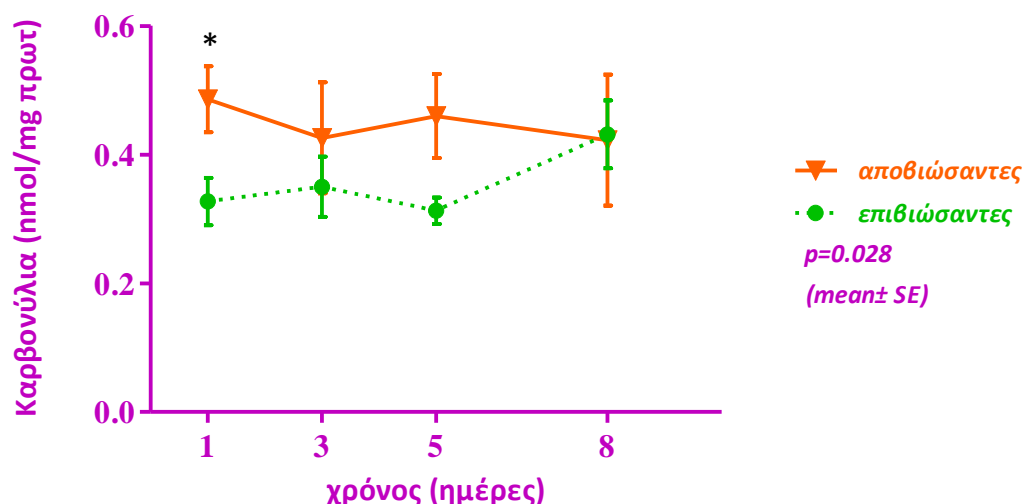
Από την post-hoc ανάλυση διαπιστώθηκε στατιστική σημαντικότητα στο 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> χρονικό σημείο μεταξύ των ομάδων με  $p < 0.01$ .

Οι τιμές της σουπεροξειδικής δισμουτάσης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες στο πλάσμα των αποβιωσάντων σε σχέση με τους επιβιώσαντες,  $p = 0.005$ , στην ανάλυση διακύμανσης δύο κατευθύνσεων (Γρ.5).



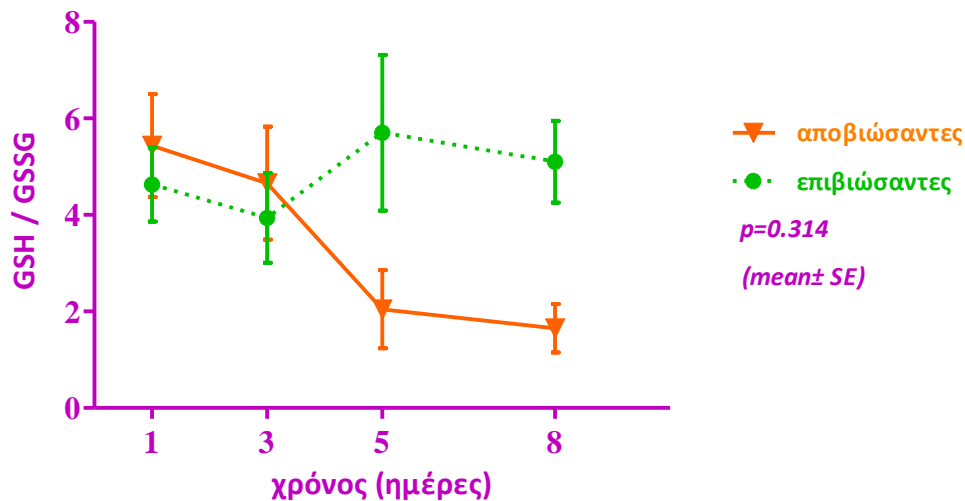
**Γράφημα 5.**Απεικόνιση μέσω των τιμών της σουπεροξειδικής δισμουτάσης στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων σε όλα τα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν  $mean \pm se$  (μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα).

Οι τιμές των καρβονυλίων του πλάσματος εκτός από την πρώτη χρονικά μέτρηση είχαν και στο σύνολό τους σημαντική διαφορά με τιμή  $p = 0.028$  (Γρ. 6).



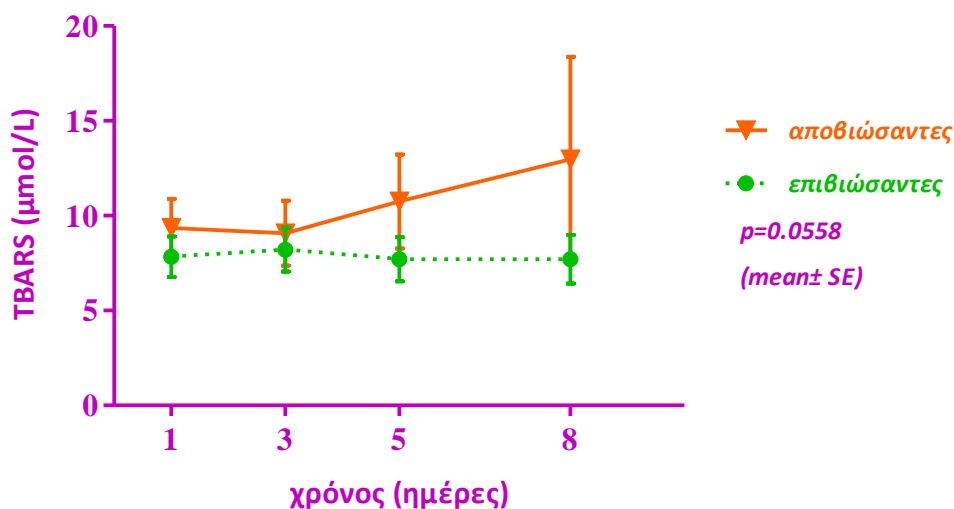
**Γράφημα 6.**Απεικόνιση μέσω των τιμών των καρβονυλίων του πλάσματος σε επιβιώσαντες-αποβιώσαντες στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα.  $P$  στατιστικά σημαντικό  $< 0.05$ . Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο χρόνο.

Ο λόγος των μετρηθέντων τιμών GSH/GSSG δεν κατέγραψε συνολικά στατιστική σημαντικότητα. Τιμή  $p = 0.314$  (Γρ.7).

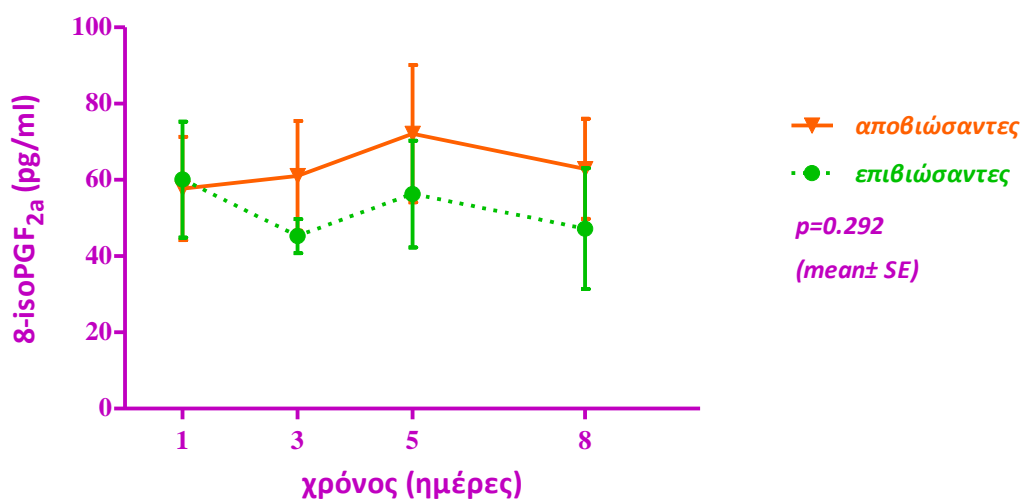


**Γράφημα 7.** Απεικόνιση μέσω των όρων των τιμών του λόγου GSH/GSSG στα ευθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων σε όλα τα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα.

Τα επίπεδα των TBARS και του 8-ισοπροστανίου, ενδεικτικά οξείδωσης των λιπιδίων, δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των ομάδων,  $p=0.292$  και οι τιμές των TBARS παρότι σημείωσαν μια αυξητική τάση στο χρόνο σε όσους κατέληξαν, τελικά αυτή δεν αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική,  $p=0.0558$  (Γρ.8 & Γρ.9).

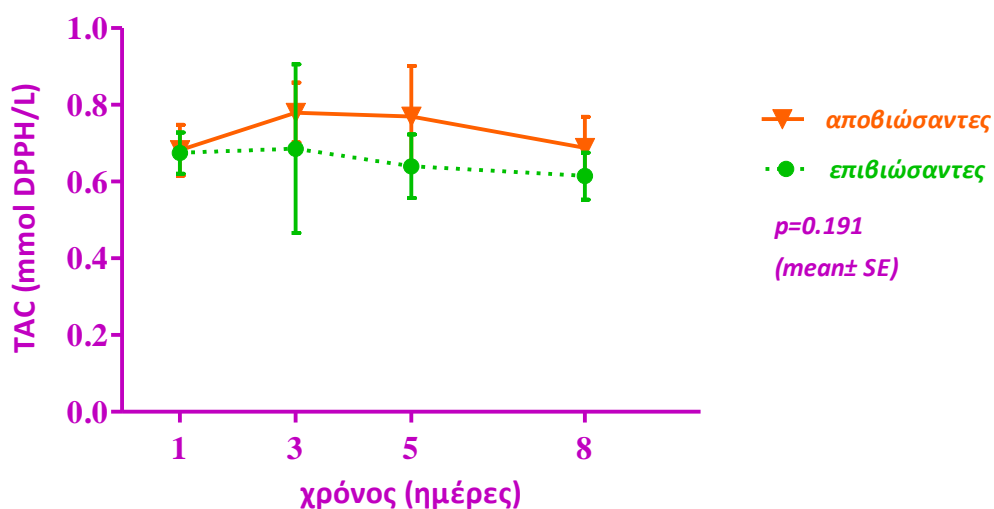


**Γράφημα 8.** Απεικόνιση μέσω των όρων των τιμών των TBARS στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα.



**Γράφημα 9.** Απεικόνιση μέσω των όρων των τιμών του 8-ισοπροστανίου στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Οι μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα επίσης δεν ανέδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες,  $p=0.191$  (Γρ. 10).



**Γράφημα 10.** Απεικόνιση μέσω των όρων των τιμών της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Ισχυρές συσχετίσεις για το σύνολο των ασθενών διαπιστώθηκαν στο πρώτο χρονικό σημείο, μεταξύ του δείκτη SOFA και της κλίμακας APACHE II score με τιμή  $p=0.02$  και  $r=0.559$ , μεταξύ των μετρήσεων του 8-isoPGF<sub>2a</sub> με τις τιμές του δείκτη SOFA ( $p=0.044$ ,  $r=-0.494$ ) και των μετρήσεων της SOD με τις μετρήσεις των TBARS ( $p=0.006$ ,  $r=0.510$ ).

Σημειώνεται πως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διακύμανση των τιμών των προαναφερόμενων βιοδεικτών στην πορεία του χρόνου εντός των μετρήσεων της κάθε ομάδας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 6.1. Συζήτηση

Τα κύρια ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι τα ακόλουθα: οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης γλουταθειόνης στους ασθενείς που κατέληξαν ήταν χαμηλότερες και παράλληλα σημειώθηκε τάση μείωσης των επιπέδων της σε σχέση με τους επιβίωσαντες με την πάροδο του χρόνου. Στους ίδιους ασθενείς διαπιστώθηκε μειωμένη δραστικότητα της καταλάσης. Σε αντίθεση καταγράφηκαν σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις της CuZnSOD στο πλάσμα στην ίδια ομάδα. Επίσης διαπιστώθηκε μεγαλύτερο επίπεδο οξειδωτικού στρες στην έναρξη των μετρήσεων και στην πρόοδο της σηπτικής καταπληξίας στους σηπτικούς ασθενείς που κατέληξαν όπως αναδείχτηκε από τον έλεγχο της οξείδωσης των πρωτεϊνών με την μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τέλος, αν και το επίπεδο οξειδωτικού στρες είναι αυξημένο στους αποβιώσαντες σε σχέση με τους επιβίωσαντες, ο ρυθμός μεταβολής του και στις δύο ομάδες δεν υπήρξε σημαντικός στη διάρκεια του σηπτικού επεισοδίου.

Στην συγκεκριμένη μελέτη προτιμήθηκε ο προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες να πραγματοποιηθεί με μετρήσεις βιοδεικτών στο πλάσμα, ως αντανάκλαση του συνολικού φορτίου του οργανισμού, ενώ το αντιοξειδωτικό προφίλ εκτιμήθηκε τόσο στο πλάσμα όσο και στα ερυθροκύτταρα.

Η επιλογή της συγκεκριμένης τακτικής βασίστηκε στο γεγονός ότι σήμερα υπάρχουν αποδείξεις πως τα ερυθροκύτταρα συνεισφέρουν σημαντικά στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών της συστηματικής κυκλοφορίας [401]. Η ανακύκλωση των αντιοξειδωτικών, και πιο συγκεκριμένα της γλουταθειόνης στα ερυθρά, είναι ιδιαίτερα γρήγορη, αγγίζει το 50-100% ημερησίως· το γεγονός αυτό αποδεικνύει

παράλληλα ότι τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται σε μεγάλα φορτία οξειδωτικού στρες [415,416]. Ακόμη, η κινητικότητα τους τα καθιστά οξειδωτικούς εξολοθρευτές σε όλο το μήκος της κυκλοφορίας.Υπάρχουν ενδείξεις πως τα ερυθροκύτταρα συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική άμυνα και άλλων ιστών σε πραγματικές συνθήκες [401,417]. Τέλος, πλεονέκτημα αποτελεί και η εύκολη πρόσβαση του ερυθροκυτταρικού ιστού.

Μέχρι την έναρξη της μελέτης, η επίδραση του οξειδωτικού στρες είχε επικεντρωθεί στην πρώιμη σήψη συνήθως με την χρήση ολικού αίματος, πλάσματος, ορού καθώς και ιστών άλλων πλην του ερυθροκυτταρικού [285,287,292,391-394,418,419].

Η γλουταθειόνη αποτελεί κύριο ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό. Οι συγκεντρώσεις της σε κάθε ιστό εμφανίζουν διαφορετική διακύμανση στην πορεία του χρόνου. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης των μυών ομαλοποιήθηκαν μέσα σε μία εβδομάδα σε ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια που νοσηλεύονταν σε μονάδα εντατικής θεραπείας όταν η πορεία τους συνοδεύονταν και από κλινική βελτίωση [419].

Περισσότερες πληροφορίες για τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης στους διάφορους ιστούς προέρχονται από πειραματικές μελέτες σε ζώα. Σε ποντίκια έχει διαπιστωθεί ότι ο ρυθμός σύνθεσης της γλουταθειόνης αυξάνει σαν απάντηση στη λοίμωξη στους πνεύμονες, στην καρδιά, στο μυϊκό ιστό, στο ήπαρ και τον σπλήνα ενώ στο αίμα ο ρυθμός παραμένει ανεπηρέαστος [420]. Όμως η παραμονή του οξειδωτικού ερεθίσματος για περισσότερες από τρεις ημέρες οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων της γλουταθειόνης στο ήπαρ [421]. Επιπλέον η κατανάλωσή της στους πνεύμονες συσχετίστηκε και με αυξημένη θνητότητα σε ποντικούς που εκτέθηκαν σε τοξικά επίπεδα οξυγόνου [422].



Οι πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης στον άνθρωπο σε παθολογικές καταστάσεις όπως η σήψη, είναι περιορισμένες. Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια, έχει περιγραφεί εξάντληση των αποθεμάτων της στο πλήρες αίμα [419]. Ακόμη, η γλουταθειόνη του ολικού αίματος και ο ρυθμός της συνθετικής της ικανότητας στα ερυθροκύτταρα βρέθηκαν μειωμένοι σε σηπτικούς παιδιατρικούς ασθενείς [423].

Οι παραπάνω μελέτες στηρίζονται στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης σε ολικό αίμα και σε πλάσμα. Όμως οι μετρήσεις στο ολικό αίμα περιλαμβάνουν την οξειδωμένη, την ανηγμένη μορφή και πιθανώς τις συνδεδεμένες με γλουταθειόνη, πρωτεΐνες. Παράλληλα, τα έως σήμερα δεδομένα για τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα βαρέως πασχόντων μπορούν να τεθούν σε αμφισβήτηση. Οι Fläring et al. [419] διαπίστωσαν εξάλειψη της ολικής γλουταθειόνης στο πλήρες αίμα ασθενών με πολυοργανική ανεπάρκεια· όμως είναι αξιοσημείωτο ότι στην ίδια μελέτη αναφέρονται υψηλότερα επίπεδα ολικής γλουταθειόνης στο πλάσμα των νοσούντων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου κατά την ίδια χρονική περίοδο [419].

Οι Andresen et al. [399] προσδιόρισαν την οξειδωμένη και την ανηγμένη γλουταθειόνη στα ερυθροκύτταρα ασθενών με σηπτική καταπληξία. Χρησιμοποίησαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και βρήκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές. Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης βρέθηκαν χαμηλότερα στους ασθενείς με κυκλοφορική καταπληξία μετά το πρώτο 24ωρο νοσηλείας ενώ της οξειδωμένης γλουταθειόνης ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τους υγιείς.

Στην δική μας μελέτη, οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης γλουταθειόνης στην εξέλιξη της σήψης, κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε όσους τελικά κατέληξαν. Μάλιστα, στην πορεία παρατηρήθηκε περαιτέρω σημαντική μείωση καθώς η σηπτική αλληλουχία δεν ανατασσόταν. Αντίθετα όσοι κατάφεραν να επιβιώσουν διατήρησαν τα επίπεδά τους, χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις κατά την χρονική διάρκεια της παρακολούθησης.

Τα ευρήματά μας υπογραμμίζουν την ανεπάρκεια των σηπτικών με καταπληξία και κακή κλινική έκβαση, να διατηρήσουν τα επίπεδα του συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού στο χρόνο. Το γεγονός αυτό αποδίδεται πιθανώς σε εντονότερη ή παρατεταμένη οξειδωτική προσβολή και/ή σε μειωμένη συνθετική ικανότητα της γλουταθειόνης σε αυτή την κατηγορία ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη όσοι κατέληξαν εμφάνιζαν υψηλότερη βαθμολογία στην κλίμακα APACHE II κατά την είσοδό τους στην μονάδα εντατικής θεραπείας, που είναι ενδεικτική νόσου με μεγαλύτερη κλινική βαρύτητα και εντονότερη φλεγμονώδη απάντηση.

Τα ερυθρά, ιδιαίτερα στη μικροκυκλοφορία, βρίσκονται σε εγγύτητα ή ακόμα και σε επαφή με το αγγειακό δίκτυο με συνέπεια να προσλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [424,425]. Παράλληλα δρουν σαν εξολοθρευτές του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του σουπεροξειδίου του πλάσματος επειδή το  $H_2O_2$  είναι λιποδιαλυτό και διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες [426] ενώ και για το σουπεροξείδιο υπάρχει κανάλι ανιόντων από το οποίο μπορεί να διακινηθεί [367]. Σε φυσιολογικές συνθήκες η συνεχής παραγωγή ελεύθερων ριζών στα ερυθρά προέρχεται από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης λόγω της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στο

αρτηριακό αίμα και της αφθονίας του περιεχόμενου σιδήρου στην αίμη που καταλήγουν σε παραγωγή σουπεροξειδίου [416]. Στη σήψη η αδυναμία πρόσληψης του οξυγόνου από τους περιφερικούς ιστούς διατηρεί υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και στο φλεβικό σκέλος της συστηματικής κυκλοφορίας που ενδεχομένως επιτείνει την οξειδωτική διεργασία στα ερυθροκύτταρα.

Η αναγκαιότητα εξουδετέρωσης όλων των προαναφερόμενων εισροών ελεύθερων ριζών οδήγησε πιθανώς στην κατανάλωση των ενδοκυττάρων αποθεμάτων της ανηγμένης γλουταθειόνης των ερυθρών στους ασθενείς που κατέληξαν. Η πιθανή συνεχής παρουσία των παραπάνω παραγόντων οδήγησε με την πάροδο του χρόνου σε εμφανή περαιτέρω σημαντική μείωση των επιπέδων σε όσους ασθενείς δεν ήταν δυνατό να ανανήψουν.

Αν και θα περίμενε κανείς εξίσου σημαντική μείωση του λόγου GSH/GSSG, αυτή δεν αναδείχτηκε στην μελέτη αλλά καταγράφηκε μία διαφαινόμενη τάση μείωσης του. Μία πιθανή εξήγηση ίσως αποτελεί η μειωμένη παραγωγή GSH και συνεπώς GSSG στους σηπτικούς ασθενείς.

Πράγματι, ο ρυθμός σύνθεσης της γλουταθειόνης φαίνεται πως καταστέλλεται στους σηπτικούς ασθενείς. Η υπεργλυκαιμία που συχνά παρατηρείται στη σήψη, οι κατεχολαμίνες, τα γλυκοκορτικοειδή σε υψηλές δόσεις, αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β ή TGF-β), ορμόνες όπως η γλυκαγόνη και η ερυθροποιητίνη, που αυξάνονται στη σήψη, επηρεάζουν αρνητικά την έκφραση του γονιδίου της λιγκάσης γλουταμικού-κυστεΐνης (GCL) και την απαραίτητη μεταγραφή του παρεμποδίζοντας την συνθετική διεργασία της γλουταθειόνης. Αρνητική επίδραση στην σύνθεση ασκεί επίσης η έλλειψη κυστεΐνης, η αδράνεια των σκελετικών μυών

και σε παρατεταμένη νόσο η μείωση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης, των γοναδοτροπινών και των θυρεοειδικών ορμονών. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες δυνητικά προάγουν την μείωση σύνθεσης της γλουταθειόνης στη σήψη [415].

Άλλη εξήγηση αποτελεί το γεγονός ότι η περίσσεια της οξειδωμένης γλουταθειόνης ενδοκυττάρια προκαλεί οξειδωτικό στρες με συνέπεια είτε να απεκκρίνεται στο πλάσμα με ενεργητικό μηχανισμό είτε να αντιδρά με θειόλες πρωτεϊνών προκαλώντας S-γλουταθειονυλίωση [427-429]. Για το λόγο αυτό οι μετρούμενες τιμές της μπορεί να μην ανταποκρίνονται πλήρως στο πραγματικό μέγεθος της οξειδωμένης γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων και ίσως έτσι και ο λόγος GSH/GSSG δεν κατέγραψε στατιστική σημαντικότητα. Σε συνάρτηση με τα παραπάνω, ο λόγος GSH/GSSG βρέθηκε μικρότερος από το 10 και στις δύο ομάδες ενώ οι φυσιολογικές του τιμές είναι μεγαλύτερες [430].

Η καταλάση είναι ένα κύριο αντιοξειδωτικό ένζυμο του ερυθροκυτταρικού ιστού. Πληροφορίες σχετικά με την δραστικότητα της καταλάσης στην πορεία της ανθρώπινης σήψης είναι σχεδόν ανύπαρκτες. Οι Warner et al. μέτρησαν την δραστικότητα της καταλάσης στα ερυθρά μέσα στο πρώτο 24ωρο από την διάγνωση της σήψης και δεν ανίχνευσαν διαφορές μεταξύ όσων επέζησαν και όσων κατέληξαν. Να σημειωθεί επίσης ότι διαπίστωσαν μεγαλύτερες τιμές στο πλάσμα και στα ερυθρά των σηπτικών σε σχέση με την υγιή ομάδα ελέγχου. Ήταν ένα αναπάντεχο εύρημα που δεν κατάφεραν να εξηγήσουν [400]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η δραστικότητα της καταλάσης που προσδιορίστηκε στο πλάσμα κατά το πρώτο 24ωρο της σήψης, δεν διέφερε ανάμεσα στους επιβιώσαντες και αποβιώσαντες και δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της κλινικής έκβασης [431].

Αντίθετα, σε άλλη παλαιότερη μελέτη η δραστικότητα της καταλάσης στον ορό, βρέθηκε υψηλότερη σε έξι σπηπτικούς ασθενείς που ανέπτυξαν στη συνέχεια σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας των ενηλίκων συγκριτικά με είκοσι άλλους που δεν το εμφάνισαν [432].

Πρέπει να τονιστεί πως η καταλάση είναι ενδοκυττάριο ένζυμο και φυσιολογικά αμελητέα ποσότητα ανιχνεύεται στο πλάσμα εκτός εάν υπάρχει κυτταρική βλάβη, αιμόλυση ή μειωμένη απέκκριση [400]. Συνεπώς οι τιμές της καταλάσης του πλάσματος δεν αφορούν αποκλειστικά σε οξειδωτικό στρες. Μάλιστα, η δραστικότητά της στο πλάσμα είναι εξαιρετικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα ερυθρά. Για το λόγο αυτό, ο προσδιορισμός της δραστικότητας της σε ιστούς, όπως ο ερυθροκυτταρικός, φαίνεται να υπερτερεί [433]. Στην τωρινή μελέτη, η δραστικότητα της καταλάσης μετρήθηκε στα ερυθρά. Τα επίπεδα καταλάσης διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους επιβίωσαντες και τους αποβιώσαντες κατά το χρονικό σημείο της διάγνωσης και στην εξέλιξη της καταπληξίας. Κατά την άποψή μας, η χαμηλότερη δραστικότητα της καταλάσης υποδηλώνει μεγαλύτερο οξειδωτικό φορτίο που υφίστανται τα ερυθρά στην ομάδα αυτών που κατέληξαν ενώ παράλληλα η βαρύτερη νόσος συνδέεται και με χειρότερες τοπικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH που επηρεάζουν την δραστικότητα του ενζύμου.

Ακόμη, η εκτίμηση της δραστικότητας της καταλάσης των ερυθροκυττάρων στην έναρξη της σπηπτικής καταπληξίας μπορεί ενδεχομένως να παρέχει την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ όσων θα επιβιώσουν και όσων θα καταλήξουν, αν και υπήρχε σημαντική αλληλοκάλυψη των τιμών των δύο ομάδων. Η παρατήρηση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Παράλληλα με τους παραπάνω αντιοξειδωτικούς δείκτες των ερυθρών προσδιορίστηκε στο πλάσμα η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ενζύμου CuZnSOD. Πρόκειται για την κύρια σουπεροξειδική δισμουτάση που εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα καθώς αυτά δεν περιέχουν μιτοχόνδρια. Μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί ενεργητικός μηχανισμός εξωκυττάριας απέκκρισης της [434]. Επομένως φυσιολογικά ίχνη της ανιχνεύονται στο πλάσμα ενώ ικανές ποσότητες είναι συνηγορητικές υπερ αιμόλυσης ή ιστικής κυτταρικής βλάβης [400,435].

Η διαπίστωση αυξημένης συγκέντρωσης της CuZnSOD στο πλάσμα των αποβιωσάντων θα μπορούσε να θεωρηθεί ενδεικτική αυξημένης αντιοξειδωτικής δυνατότητας. Βέβαια, η απελευθέρωσή της από προσβεβλημένους ιστούς δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επίσης ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου με ELISA ίσως να μην ήταν η απόλυτα ενδεικνυόμενη μέθοδος [436]. Άρα η αυξημένη παρουσία του στο πλάσμα μπορεί περισσότερο να αξιολογηθεί ως απόρροια ιστικής προσβολής και απελευθέρωσης του ενζύμου στην κυκλοφορία που συνδέεται με την βαρύτητα της κλινικής νόσου, παρά σαν ενίσχυση του αντιοξειδωτικού του δυναμικού. Το εύρημα αυτό συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα των Warner et al. [400] και των Guerreiro et al. που εφάρμοσαν μία μόνο μέτρηση ωστόσο οι τελευταίοι απέδωσαν την αυξημένη δραστικότητα της SOD που εντόπισαν στο πλάσμα των σηπτικών αποβιωσάντων μάλλον αυθαίρετα σε δράση της ecSOD [431]. Από την αναζήτηση της σχετικής βιβλιογραφίας διαπιστώνεται ότι από τις έως τώρα δημοσιευμένες μελέτες οι τιμές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έχουν αναφερθεί αυξημένες σε σηπτικούς ενήλικες και νεογνά, σε σύγκριση με μια υγιή ομάδα ελέγχου [292,437]. Επιπλέον οι τιμές τους δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την βαρύτητα της σήψης στην μελέτη των Luchtemberg et al. [438] ενώ αντίθετα ήταν

σημαντικά αυξημένες στη μελέτη των Guerreiro et al. [431] στους ασθενείς που απεβίωσαν, εύρημα με το οποίο συμφωνούν και τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Οι τιμές τους ήταν σημαντικά διαφορετικές στις δύο ομάδες. Ιδιαίτερα στην υποομάδα των αποβιωσάντων εξαιτίας της καταπληξίας ήταν επίσης σημαντικά αυξημένες. Ωστόσο στην μελέτη των Andresen et al. [399] αναφέρεται πως η οξειδωτική προσβολή των πρωτεϊνών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου βαίνοντας παράλληλα με την μείωση του δείκτη SOFA. Όμως αντίστοιχη μείωση δεν διαπιστώθηκε στην υποκείμενη μελέτη σε αυτούς που βελτίωσαν τον δείκτη SOFA δηλαδή σε όσους επιβίωσαν στην πορεία του χρόνου. Το γεγονός θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαφορά της δομής και στις διαφορετικές μεθόδους μέτρησης του βιοδείκτη μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων.

Σημαντικές διαφορές αναφορικά με την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα δεν διαπιστώθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων σε κανένα από τα χρονικά σημεία της μελέτης. Υπάρχει μία διχογνωμία σχετικά με τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα σε σοβαρή σήψη και σηπτική καταπληξία ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο μέτρησης και το υλικό προσδιορισμού. Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιείται πλάσμα ή ορός για την αξιοπιστία των μετρήσεων [394,339]. Από ορισμένους ερευνητές έχουν αναφερθεί υψηλότερα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στη σοβαρή σήψη και στους ασθενείς που αποβιώνουν ενώ άλλοι αντιτίθενται σε αυτό, αναφέροντας μείωση ή καμία διαφορά από την ομάδα ελέγχου [394,395,440,441]. Επίσης μείωση της TAC έχει περιγραφεί προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου στους σηπτικούς [441]. Ακόμη στη μελέτη των Chuang et al. περιγράφεται συσχέτιση των μετρήσεων της TAC με την κλινική βαρύτητα και την επιβίωση [394]. Στην δική μας μελέτη που

επικεντρώθηκε αποκλειστικά σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία κάτι τέτοιο δεν αναδείχτηκε. Βέβαια, τα παραπάνω αποτελέσματα είναι συνέπεια και των διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού του βιοδείκτη. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η TAC και τα ισοδύναμά της έχουν δεχτεί κριτική για την επάρκεια τους να ανιχνεύουν το οξειδωτικό στρες [442].. Πράγματι η TAC προσδιορίζει μόνο ένα μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς η ενζυμική αντιοξειδωτική δράση δεν περιλαμβάνεται σε αυτή. Ωστόσο αποτελεί μια απλή μέθοδο προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες και είναι χρήσιμη όταν συνδυάζεται και με άλλες αναλύσεις όπως και έγινε στη συγκεκριμένη περίπτωση [443].

Η οξείδωση των λιπιδίων προσδιορίστηκε με δύο μεθόδους. Οι μετρήσεις των TBARS δεν ανέδειξαν διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Οι Motoyama et al. υποστήριξαν ότι τα TBARS είναι αυξημένα σε όσους καταλήγουν εξαιτίας μιας βαριάς συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης συνοδευόμενης με πολυοργανική ανεπάρκεια όμως αποδέχθηκε μία ευρεία διακύμανση των μετρήσεων ανάλογα με το αίτιο της φλεγμονώδους απάντησης [300]. Οι Winterbourn et al. [292] από την άλλη δεν διαπίστωσαν καμία διαφορά στις τιμές των TBARS στους σηπτικούς ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς για χρονική διάρκεια παρακολούθησης δέκα ημερών. Αν και ο προσδιορισμός των TBARS είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία ανίχνευσης της οξείδωσης των λιπιδίων, η μέθοδος έχει υποστεί σημαντική κριτική λόγω της έλλειψης ειδικότητας και της πρόκλησης τεχνικών σφαλμάτων κατά την μέτρηση [444].

Όμως, ο προσδιορισμός των ισοπροστανίων και πιο συγκεκριμένα του 8-isoPGF<sub>2α</sub> που συνήθως προσδιορίζεται, θεωρείται σήμερα μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους ανίχνευσης της λιπιδιακής οξείδωσης σε πραγματικές συνθήκες, λόγω της



χημικής σταθερότητας, της υψηλής ειδικότητας και της παρουσίας του μορίου σε όλους τους υγιείς βιολογικούς ιστούς και υγρά [61]. Μάλιστα έχει βρεθεί πως τα επίπεδά του στο πλάσμα σχετίζονται με την νεφρική, ηπατική ανεπάρκεια και τις διαταραχές της πήξης σε βαρέως πάσχοντες με σοβαρή σήψη [445]. Σε μια άλλη μελέτη σε μεικτό πληθυσμό ασθενών εντατικής θεραπείας, οι τιμές των ισοπροστανίων κατά την εισαγωγή, ήταν σημαντικά αυξημένες σε όσους αποβίωσαν και παρουσίαζαν συσχέτιση με την εμφάνιση πολυοργανικής ανεπάρκειας [289]. Στην τωρινή μελέτη δεν αναδείχτηκαν διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ίσως επειδή η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει αποκλειστικά βαριά σηπτικούς ασθενείς με κυκλοφορική καταπληξία και το δείγμα του πληθυσμού είναι μικρότερο.

Στους περιορισμούς της συγκεκριμένης μελέτης συγκαταλέγεται το γεγονός της εφαρμογής της σε ένα ερευνητικό κέντρο και του σχετικά περιορισμένου αριθμού ασθενών που έχουν συμπεριληφθεί. Ακόμη οι οξειδωτικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και όλοι όσοι έχουν χρησιμοποιηθεί στις διάφορες μελέτες, έχουν δεχτεί κριτική για την αξιοπιστία τους ως προς την ταυτοποίηση του οξειδωτικού στρες. Όμως πρέπει να τονιστεί ότι διερευνήθηκαν διαφορετικές οδοί με περισσότερους από ένα δείκτες σε διαφορετικά υποστρώματα, πλάσμα και ερυθροκύτταρα. Φυσικά είναι σαφές πως νεότερες πειραματικές και κλινικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών είναι αναγκαίες, προκειμένου να κατανοήσουμε επαρκώς την παθοφυσιολογία, τις αλληλεπιδράσεις και το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην πορεία της σήψης και της σηπτικής καταπληξίας.

## 6.2. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παραπάνω μελέτη καταγράφηκε η παρουσία αυξημένου οξειδωτικού στρες και μεγαλύτερου αντιοξειδωτικού ελλείματος στους βαριά σηπτικούς ασθενείς με κυκλοφορική καταπληξία συγκριτικά με όσους αναρρώνουν από την σήψη. Το οξειδωτικό στρες ταυτοποιήθηκε από την αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ενώ συνηγορητική είναι και η παρουσία του ενδοκυττάριου αντιοξειδωτικού ελλείματος που εντοπίστηκε με την μέτρηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης και της δραστικότητας της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα. Το έλλειμμα αυτό διατηρήθηκε και μάλιστα επιτάθηκε κατά την διάρκεια του σηπτικού επεισοδίου σε αυτούς που κατέληξαν. Δεν είναι γνωστή η συνεισφορά του ενδοκυττάριου αντιοξειδωτικού ελλείματος των ερυθρών στην κλινική έκβαση των ασθενών, εάν αυτό συνιστά απλά και μόνο συνέπεια μιας ανεξέλεγκτης νόσου ή εάν θα μπορούσαν να τεθούν όρια ασφαλείας και να αναζητηθούν στοχευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Αρκετές μελέτες έχουν διενεργηθεί μέχρι σήμερα που αφορούν στη χορήγηση αντιοξειδωτικών σε ασθενείς της ΜΕΘ χωρίς να έχουν καταλήξει σε σαφή και οριστικά συμπεράσματα. Καθώς επιβεβαιώνεται με την πάροδο του χρόνου πως οι μηχανισμοί που διέπουν την διεργασία του οξειδωτικού στρες είναι πολυπαραγοντικοί και δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί, νεότερες μελέτες είναι αναγκαίες προκειμένου να πιστοποιηθούν και να ενισχυθούν τα ευρήματα της δικής μας έρευνας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 2<sup>nd</sup> ed, Oxford, Clarendon Press, 1989.
2. Aikens J, Dix TA. Peroxyhydroxyl radical (HOO•) Initiated lipid-peroxidation—The role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 1991, 266, 15091–15098.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 1993, 49(3), 481-93.
4. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med*, 1990, 8, 95–108.
5. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr*, 2001, 85, (2), S67±S74.
6. Line MA. The enigma of the origin of life and its timing. *Microbiology*, 2002, 148, 21-27.
7. Raymond J, Segre D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science*, 2006, 311, 1764-1767.
8. Lindahl SGE. Oxygen and life on earth: an anesthesiologist’s views on oxygen evolution, discovery, sensing, and utilization. *Anesthesiology*, 2008, 109, 7-13.
9. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res*, 1998, 28, 601–609.
10. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2005, 12, 1161–1208.
11. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub> in the production of HO•: In vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16, 29–33.
12. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37, 1921–1942.
13. Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994, 102, 5-12.
14. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J Mol Biol*, 2000, 304, 55–68.
15. Liochev SI, Fridovich I. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep*, 2002, 7, 55–57.
16. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 1999, 13, 295-309.
17. Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol*, 2007, 42, 256–262.
18. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4, 181–189.

19. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007, 87( 1), 245-313.
20. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C. J, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266, 37–56.
21. Cooper GM. *The Cell. A Molecular Approach*. 2<sup>nd</sup> ed, Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.
22. Zangar RC, Dmitri R, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 199, 316– 331.
23. Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 1992, 257, 1496–1502.
24. Van der Vlies D, Makinje M, Jansens A, Braakman I, Verkleij AJ, Wirtz KW et al. Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5, 381–387.
25. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341–346, 2004.
26. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15, 411–421.
27. Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med*, 1992, 13, 391±405.
28. Winterbourn CC. Free radical production and oxidative reactions of haemoglobin. *Environ Health Persp*, 1985, 64, 321±330.
29. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *J Toxicol*, 2011, Article ID 487074.
30. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int J Environ Res Public Health* 2009, 6, 445-462.
31. Liebel F, Simarna Kaur S, Ruvo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *J Invest Dermatol*, 2012, 132, 1901–1907.
32. Poljsak B, Dahmane R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging Dermatology. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012:135206.
33. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2000, 32(9), 1576-81.
34. Bailey SM, Pietsch EC, Cunningham CC. ETHANOL STIMULATES THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AT MITOCHONDRIAL COMPLEXES I AND III. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27, 891–900.
35. Mohanty P, Ghanim H, Hamoud W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75, 767–72.

36. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47–95.
37. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279, L1005–L1028.
38. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide—A physiological messenger. *Ann Intern Med*, 1994, 120, 227–237.
39. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 2005, 10, 1881–1896.
40. Sun T, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21, 335–348.
41. Mulder KM. Role of Ras and MAPKs in TGF beta signaling. *Cytokine Growth Fact Rev*, 2000, 11, 23–35.
42. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*, 1997, 24, 287–296.
43. Abe J, Berk BC. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 274, 1999, 21003–21010.
44. Salmeen A, Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antiox Redox Signal*, 2005, 7, 560–577.
45. Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-2. *Biochem J*, 1998, 336, 241–246.
46. Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 28, 2000, 1349–1361.
47. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 2001, 81, 807–869.
48. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10), 813–24.
49. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004, 142, 231–55.
50. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*, 2004, 11, 1105–1112.
51. Siems WG, Grune T, Esterbauer H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sci*, 1995, 57, 785–789.
52. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res-Fund Mol Mech Mutagen*, 1999, 424, 83–95.
53. Wang MY, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, deAndrade M, Li DH. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 1996, 5, 705–710.
54. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 1997, 6, 391–397.

55. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> edn, Oxford, Oxford University Press, 1999.
56. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress* edn, London, Academic Press, 1985.
57. Juranek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 61, 240–247.
58. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 1993, 215, 213–219.
59. Forkink M, Smeitink AMJ, Brock R, Willems HGMP, Koopman JHW. Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797, 1034–1044.
60. Arent MA, de Souza FL, Walz R, Dafre LA. Perspectives on Molecular Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Traumatic Brain Injury. *BioMed Res Int*, 2014, Article ID 723060.
61. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, 2006, 52(4), 601–623.
62. Berliner J, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20, 707–27.
63. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*, 2003, 24, 167–75.
64. Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2005, 30.
65. Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166, 490–5.
66. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2004, 38, 105–22.
67. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 279–86.
68. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23, 360–6.
69. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*, 2004, 18, 1791–800.
70. Tsikas D, Schwedhelm E, Fauler J, Gutzki FM, Mayatepek E, Frolich JC. Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F2a in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 1998, 716, 7–17.
71. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med*, 2002, 23, 101–208.

72. Collins AR, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Vina J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423, 57–65.
73. Halliwell B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med* 2002, 32, 968–74.
74. Kadiiska MB, Gladen BC, Bard DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of Oxidative Stress Study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005, 38, 698–710.
75. Winterbourn CC, Buss H. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Enzymol*, 1999, 300, 106–11.
76. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol*, 2000, 99, 15–24.
77. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003, 329, 23–8.
78. Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R et al. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830 (5), 3329–49.
79. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003, 333, 19–39.
80. Mills BJ, Weiss MM, Lang CA, Liu MC, Ziegler C. Blood glutathione and cysteine changes in cardiovascular disease. *J Lab Clin Med*, 2000, 135, 396–402.
81. Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, Perez P, et al. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 410–8.
82. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27, 1080–6.
83. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med*, 2004, 8, 201–12.
84. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. Is there a role for S-glutathionylation of proteins in human disease? *IUBMB Life*, 2005, 57, 189–92.
85. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000, 21, 361–370.
86. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160, 1–40.
87. Hehner SP, Breitkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, et al. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol*, 2000, 165, 4319–4328.
88. Roy P, Saha A. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Curr Sci*, 2002, 82, 38–45.
89. Dreves J, Medinger M, Schmidt-Gersbach C, Weber R, Unger C. Receptor tyrosine kinases: The main targets for new anticancer therapy. *Curr Drug Targ*, 2003, 4, 113–121.
90. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein, B, Harris CC. p53 mutations in human cancer. *Science*, 1991, 253, 49–53.

91. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407, 249–257.
92. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30, 1191–1212.
93. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003, 333, 19–39.
94. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*, 1996, 32A, 30–38.
95. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28, 1717–1725.
96. Romer JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*, 1999, 34, 43–949.
97. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free-radical system—From equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res*, 1992, 26, 641–655.
98. Molavi B, Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: Molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Cardiol*, 2004, 19, 488–493.
99. Perez NG, Gao WD, Marban E. Novel myofilament Ca<sup>2+</sup>-sensitizing property of xanthine oxidase inhibitors. *Circul Res*, 1998, 83, 423–430.
100. Khan SA, Kwangho L, Minhas KM, Gonzales DR, Raju S. VY, Tejani AD et al. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 15944–15948.
101. Foster MW, Stamler JS. New insights into protein S nitrosylation—Mitochondria as a model system. *J Biol Chem*, 2004, 279, 25891–25897.
102. Matsumoto A, Comatas KE, Liu L, Stamler JS. Screening for nitric oxide-dependent protein–protein interactions. *Science*, 2003, 301, 657–661.
103. Cote CG, Yu FS, Zulueta JJ, Vosatka RJ, Hassoun PM. Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial derived nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1996, 15, L869–L874.
104. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*, 2004, 363, 1365–1367.
105. Kalikiri PC, Sachan RSGS. Ischemic and anesthetic preconditioning of the heart: An insight into the concepts and mechanisms. *Internet J Anesthesiol*, 2004, 8(2).
106. Skyschally A, Schulz R, Gres P, Korth HG, Heusch G. Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284, H698–H703.
107. Kasparova S, Brezova V, Valko M, Horecky J, Mlynarik V, Liptaj T et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int*, 2005, 46, 601–611.
108. Granger DN, Stokes KY, Shigematsu T, Cerwinka WH, Tailor A, Kriegelstein CF. Splanchnic ischaemia-reperfusion injury: Mechanistic insights provided by mutant mice. *Acta Physiol Scand*, 2001, 173, 83–91.



109. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 10895–10900.
110. Maurice MM, Nakamura H, van der Voort EAM, van Vliet AI, Staal FJT, Tak PP et al. Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 1997, 158, 1458–1465.
111. Cunnane G, FitzGerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arth Rheumat*, 2001, 44, 2263–2274.
112. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 2000, 404, 787–790.
113. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14, S221–S226.
114. Butler R, Morris AD, Belch JJF, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*, 2000, 35, 746–751.
115. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 2003, 52, 581–587.
116. Hink U, Li HG, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, 2001, 88, E14–E22.
117. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem*, 2001, 34, 265–270.
118. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*, 2001, 114, 2903–2910.
119. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 2005, 289, F420–F430.
120. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione-peroxidase in pancreatic-islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*, 1981, 199, 393–398.
121. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers DG. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic b-cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79, 927–930.
122. Kaneto H, Kajimoto Y, Fujitani Y, Matsuoka T, Sakamoto K, Matsuhisa MM et al. Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells: Possible implication in beta-cell dysfunction. *Diabetologia*, 1999, 42, 1093–1097.
123. Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41, 202–212.
124. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*, 2002, 23, 655–664.

125. Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2004, 29, 569–577.
126. Peng J, Andersen JK. The role of c-jun N-terminal kinase JNK in Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 2003, 55, 267–271.
127. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* 2009, 25, 83-101.
128. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992, 101, 1481-3.
129. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*, 2013, 41, 580-637.
130. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29, 1303-10.
131. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*, 2013, 41, 1167-1174.
132. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 2006, 34, 344-353.
133. Angus CD, Van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *NEJM*, 2013, 9, 369.
134. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*, 2006, 34, 15-21.
135. Mayr BF, Yende S, Angus CD. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 2014, 5(1), 4–11.
136. Goodwin AJ, Rice DA, Simpson KN, Ford DW. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*, 2015, 43(4), 738-46.
137. Tiru B, DiNino EK, Orenstein A, Mailloux PT, Pesaturo A, Gupta A et al. The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis. *Pharmacoeconomics*, 2015.
138. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140, 805–820.
139. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13, 159–175.
140. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 2005, 125, 629–637.
141. Pendyala S, Natarajan V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010, 174, 265–271.
142. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1999, 93, 1464–1476.
143. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*, 1959, 234, 1355–1362.
144. Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, and Natarajan V. Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11, 841–860.

145. Griffith B, Pendyala S, Hecker L, Lee PJ, Natarajan V, and Thannickal VJ. NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11, 2505–2516.
146. Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, El BJ. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem*, 1999, 274, 20704–20708.
147. Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y et al. A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006, 116, 2033–2043.
148. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP et al. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest*, 1998, 101: 455–463.
149. Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, and El-Benna J. TNF- $\alpha$  induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, 2003, 171, 4392–4398.
150. Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ et al. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Circ Res*, 2002, 90, 143–150.
151. Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF- $\alpha$ -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1998, 176, 150–165.
152. Notcovich C, Diez F, Tubio MR, Baldi A, Kazanietz MG, Davio C, Shayo C. Histamine acting on H1 receptor promotes inhibition of proliferation via PLC, RAC, and JNK-dependent pathways. *Exp Cell Res*, 2010, 316, 401–411.
153. Kim KS, Takeda K, Sethi R, Pracyk JB, Tanaka K, Zhou YF et al. Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1. *J Clin Invest*, 1998, 101, 1821–1826.
154. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*, 2002, 91, 406–413.
155. van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R et al. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 285, C343–C352.
156. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16, 1323–1367.
157. O'Malley Y, Fink BD, Ross NC, Prinszano TE, Sivitz WI. Reactive oxygen and targeted antioxidant administration in endothelial cell mitochondria. *J Biol Chem* 2006, 281, 39766–39775.
158. Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2004, 29, 569–577.
159. Ichimura H, Parthasarathi K, Quadri S, Issekutz AC, Bhattacharya J. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J Clin Invest*, 2003, 111, 691–699.
160. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*, 2011, 208, 417–420.

161. Rowlands DJ, Islam MN, Das SR, Huertas A, Quadri SK, Horiuchi K et al. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *J Clin Invest*, 2011, 121, 1986–1999.
162. Goto H, Nishikawa T, Sonoda K, Kondo T, Kukidome D, Fujisawa K et al. Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366, 814–820.
163. Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9, 343–353.
164. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H et al. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 77 (1), S41–S45.
165. Schrauwen P, Hesselink MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004, 53, 1412–1417.
166. Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, 2002, 106, 544–549.
167. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*, 2007, 100, 460–473.
168. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27, 229–265.
169. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011, 469, 221–225.
170. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797, 897–906.
171. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 1289–1301.
172. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24, 413–420.
173. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 2006, 113, 1708–1714.
174. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 2001, 103, 1282–1288.
175. Sharma S, Smith A, Kumar S, Aggarwal S, Rehmani I, Snead C et al. Mechanisms of nitric oxide synthase uncoupling in endotoxin-induced acute lung injury: role of asymmetric dimethylarginine. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52, 182–190.
176. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, 2001, 88, E14–E22.
177. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, 2002, 90, E58–E65.

178. Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest*, 1992, 89, 197–202.
179. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*, 2006, 58, 87–114.
180. Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294, 233–245.
181. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79, 7634–7638.
182. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 1973, 248, 4793–4896.
183. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 2032–6.
184. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res* 2003, 93, 622–9.
185. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167, 1600–1619.
186. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. "Peroxisomes" *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> ed, New York, Garland Science, 2002.
187. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533, 222–239.
188. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *FEBS J*, 2008, 275, 3959–3970.
189. Savaskan NE, Ufer C, Kühn H, Borchert A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem*, 2007, 388, 1007–1017.
190. Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr*, 2012, 50, 91–105.
191. Wood AZ, Schröder E, Harris JR, Poole BP. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(1), 32–40.
192. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Yamadori T et al. Aggravation of bleomycin induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45, 600–609.

193. Park J, Lee S, Lee S, Kang SW. 2-Cys Peroxiredoxins: Emerging Hubs Determining Redox Dependency of Mammalian Signaling Networks. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014:715867.
194. Arnér SJE, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 2000, 267, 6102±6109.
195. Nakamura T, Nakamura H, Hoshino T, Ueda S, Wada H, Yodoi J. Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7, 60–71.
196. Sage PT, Carman CV. Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front Biosci*, 2009, 14, 5066–5083.
197. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 2005, 106, 584–592.
198. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 2011, 118, 6743–6751.
199. Evans R, Patzak I, Svensson L, De FK, Jones K, McDowall A et al. Integrins in immunity. *J Cell Sci*, 2009, 122, 215–25.
200. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 1996, 156, 2558–2565.
201. van Buul JD, Allingham MJ, Samson T, Meller J, Boulter E, Garcia-Mata R et al. RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration. *J Cell Biol*, 2007, 178, 1279–1293.
202. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*, 2004, 167, 377–388.
203. Barreiro O, Zamai M, Yanez-Mo M, Tejera E, Lopez-Romero P, Monk PN et al. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol*, 2008, 183, 527–542.
204. Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B, Nourshargh S. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, 2009, 113, 6246–6257.
205. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res*, 1999, 84: 516–524.
206. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF- $\kappa$ B site and p65 homodimers. *J Biol Chem*, 1995, 270, 933–943.
207. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*, 1999, 66, 876–888.
208. Fan J, Frey RS, Rahman A, Malik AB. Role of neutrophil NADPH oxidase in the mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  -induced NF- $\kappa$ B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2002, 277, 3404–3411.

209. Ceriello A, Novials A, Ortega E, La SL, Pujadas G, Testa R et al. Evidence that hyperglycemia after recovery from hypoglycemia worsens endothelial function and increases oxidative stress and inflammation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2012, 61: 2993–2997.
210. Cominacini L, Fratta PA, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A et al. E-selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia*, 1997, 40: 584–589.
211. De MG, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Proietti A, De Luca O, Armiento A, Ferri C. Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*, 1998, 41, 1392–1396.
212. Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39, 1145–1150.
213. Mehta D and Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 2006, 86, 279–367.
214. Kevil CG, Okayama N, Trocha SD, Kalogeris TJ, Coe LL, Specian RD et al. Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers. *Microcirculation*, 2008, 5, 197–210.
215. Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15, 1179–1193.
216. Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem*, 2001, 276, 2733–2741.
217. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 1986, 103, 755–766.
218. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 2004, 84, 869–901.
219. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A et al. The conditional inactivation of the *betacatenin* gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol*, 2003, 162, 1111–1122.
220. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 9815–9820.
221. Keilhack H, Hellman U, van HJ, van RF, Godovac- Zimmermann J, Bohmer FD. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. *J Biol Chem*, 2000, 275, 26376–26384.
222. Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Bohmer FD, Wang J, Reynolds AB. Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J Biol Chem*, 2001, 276, 28006–28013.
223. Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmari E et al. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2005, 25, 129–139.

224. Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH. A new approach for the investigation of reperfusion related brain injury. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34, 1366–1369.
225. Walter JK, Castro V, Voss M, Gast K, Rueckert C, Piontek J et al. Redox-sensitivity of the dimerization of occludin. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66, 3655–3662.
226. DeMaio L, Rouhanizadeh M, Reddy S, Sevanian A, Hwang J, Hsiai TK. Oxidized phospholipids mediate occludin expression and phosphorylation in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290, H674–H683.
227. Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J*, 2002, 368, 471–481.
228. Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L et al. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem*, 2009, 284, 1559–1569.
229. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG et al. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci*, 2008, 121, 29–37.
230. Monaghan-Benson E, Burridge K. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2009, 284, 25602–25611.
231. van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2002, 115, 1837–1846.
232. Van Buul JD, Anthony EC, Fernandez-Borja M, Burridge K, Hordijk PL. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) mediates vascular endothelial-cadherin-based cell-cell adhesion by regulating beta-catenin tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 2005, 280, 21129–21136.
233. Tai LK, Okuda M, Abe J, Yan C, Berk BC. Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22, 1790–1796.
234. Usatyuk PV, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *J Biol Chem*, 2006, 281, 35554–35566.
235. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress induced actin reorganization mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 1997, 80, 383–392.
236. Phillips PG, Lum H, Malik AB, Tsan MF. Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin. *Am J Physiol*, 1989, 257, 562–567.
237. Stelzner TJ, Weil JV, O'Brien RF. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J Cell Physiol*, 1989, 139, 157–166.
238. DalleDonne I, Milzani A, Colombo R. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophys J*, 1995, 69, 2710–2719.
239. Milzani A, Rossi R, Di SP, Giustarini D, Colombo R, DalleDonne I. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. *Protein Sci*, 2000, 9, 1774–1782.



240. England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep*, 2005, 10, 237–245.
241. Lum H, Del Vecchio PJ, Schneider AS, Goligorsky MS, Malik AB. Calcium dependence of the thrombin-induced increase in endothelial albumin permeability. *J Appl Physiol*, 1989, 66, 1471–1476.
242. Malik AB, Fenton JW. Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Semin Thromb Hemost*, 1992, 18, 193–199.
243. Sandoval R, Malik AB, Naqvi T, Mehta D, Tiruppathi C. Requirement for  $Ca^{2+}$  + signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280, 239–247.
244. Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D.  $Ca^{2+}$ -TRPC6-mediated  $Ca^{2+}$  entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem*, 2007, 282, 7833–7843.
245. Dreher D, Junod AF. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1995, 162, 147–153.
246. Hecquet CM, Malik AB. Role of  $H_2O_2$ -activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost*, 2009, 101, 619–625.
247. Groschner K, Hingel S, Lintschinger B, Balzer M, Romanin C, Zhu X, Schreibmayer W. Trp proteins form storeoperated cation channels in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett*, 1998, 437, 101–106.
248. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium*, 2011, 50, 279–287.
249. Wang Z, Wei X, Zhang Y, Ma X, Li B, Zhang S, Du P et al. NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24, 619–626.
250. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Schnitzler M et al. Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun*, 2012, 3, 649.
251. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, 1995, 163, 510–522.
252. Moy AB, Van EJ, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I et al. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest*, 1996, 97, 1020–1027.
253. Shi S, Verin AD, Schaphorst KL, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, Irwin RP et al. Role of tyrosine phosphorylation in thrombin-induced endothelial cell contraction and barrier function. *Endothelium*, 1998, 6, 153–171.
254. Zhao Y, Davis HW. Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1998, 174, 370–379.
255. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 2005, 118, 843–846.
256. Van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat*, 2002, 200, 549–560.

257. Gopalakrishnan S, Dunn KW, Marrs JA. Rac1, but not RhoA, signaling protects epithelial adherens junction assembly during ATP depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283, 261–272.
258. Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M, Malik AB. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res*, 2004, 94, 159–166.
259. Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M et al. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell*, 2002, 13, 1175–1189.
260. Van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2002, 115, 1837–1846.
261. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 11233–11237.
262. Wang XT, McCullough KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ. Oxidative stress-induced phospholipase C gamma1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem*, 2001, 276, 28364–28371.
263. Hempel A, Lindschau C, Maasch C, Mahn M, Bychkov R, Noll T et al. Calcium antagonists ameliorate ischemia-induced endothelial cell permeability by inhibiting protein kinase C. *Circulation*, 1999, 99, 2523–2529.
264. Meier M, King GL. Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease. *Vasc Med*, 2000, 5, 173–185.
265. Johnson A, Phillips P, Hocking D, Tsan MF, Ferro T. Protein kinase inhibitor prevents pulmonary edema in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol*, 1989, 256, 1012–1022.
266. Siflinger-Birnboim A, Goligorsky MS, Del Vecchio PJ, Malik AB. Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Lab Invest*, 1992, 67, 24–30.
267. Ryan KA, Smith MF, Jr., Sanders MK, Ernst PB. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun*, 2004, 72, 2123–2130.
268. Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol*, 2004, 173, 3589–3593.
269. Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 2003, 112, 1234–1243.
270. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48, 749–762.
271. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*, 2003, 115, 61–70.
272. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y et al. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J*, 2003, 22, 3898–3909.

273. Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, Han HJ, Song WK et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-linked cascade. *J Biol Chem*, 2000, 275, 32357–32362.
274. Wang L, Azad N, Kongkaneramt L, Chen F, Lu Y, Jiang BH et al. The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *J Immunol*, 2008, 180, 3072–3080.
275. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 1998, 17, 1675–1687.
276. Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 19126–19131.
277. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004, 305, 626–629.
278. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$  induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120: 649–661, 2005.
279. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI et al. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37, 1963–1985.
280. Nakagawa Y. Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1011, 177–184.
281. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 1259–1263.
282. Gonzalez F, Pariselli F, Dupaigne P, Budihardjo I, Lutter M, Antonsson B et al. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ*, 2005, 12, 614–626.
283. Lamb JA, Ventura JJ, Hess P, Flavell RA, Davis RJ. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* 11: 1479–1489, 2003.
284. Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky SA, Ignarro JL et al. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40, 398 – 406.
285. Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonel LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2002, 30, 1782–1786.
286. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care*, 2002, 11, 543–551.
287. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*, 1995, 23, 646–651.
288. Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem*, 2005, 42, 269–276.
289. Fink M. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8, 6–11.

290. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 2002, 122, 314–320.
291. Ritter C, Andrades M, Guerreiro M, Zavaschi L, Gelain DP, Souza LF et al. Plasma oxidative parameters and mortality in patients with severe burn injury. *Intensive Care Med*, 2003, 29, 1380–1383.
292. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med*. 28:143–149;2000.
293. Polidori MC, Mecocci P, Frei B. Plasma vitamin C levels are decreased and correlated with brain damage in patients with intracranial hemorrhage or head trauma. *Stroke*, 2001, 32, 898–902.
294. Berger MM, Shenkin A. Trace elements in trauma and burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1998, 1, 513–517.
295. Leverve X. Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects. *Intensive Care Med*, 2003, 29, 511–514.
296. Berger MM, Shenkin A, Revelly JP, Roberts E, Cayeux MC, Baines M et al. Copper, selenium, zinc and thiamine balances during continuous venovenous hemodiafiltration in critically ill patients. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80, 410–416.
297. De Berranger E, Colinet S, Michaud L, Cremer R, Fourrier C, Brévière GM et al. Severe selenium deficiency secondary to chylous loss. *J Parenter Enter Nutr* 2006, 30, 173–174.
298. Mizock AB. Immunonutrition and critical illness: An update. *Nutrition*, 2010, 26, 701–707.
299. Metnitz PGH, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*, 1999, 25, 180–185.
300. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2003, 31, 1048–1052.
301. Manzanares W, Langlois PL, Hardy G. Update on antioxidant micronutrients in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(6), 719–725.
302. Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 2012, 16(2), R66.
303. Reddell L, Cotton BA. Antioxidants and micronutrient supplementation in trauma patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15(2), 181–187.
304. Khalid A, Hanafy KA, Selim MH. Antioxidant strategies in neurocritical care. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(1), 44–55.
305. Berger MM, Chioléro RL. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2007, 35(9), 584–90.
306. Berger MM, Shenkin A. Update on clinical micronutrient supplementation studies in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9(6), 711–6.

307. Heyland DK, Dhaliwal R, Suchner U, Berger MM. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Med*, 2005, 31(3), 327-337.
308. Wischmeyer PE. Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24, 190-197.
309. Oehler R, Pusch E, Dungal P, Zellner M, Eliassen MM, Brabec M et al. Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes. *Br J Nutr*, 2002, 87, S17.
310. Wischmeyer PE. Glutamine: mode of action in critical illness. *Crit Care Med*, 2007, 35 (suppl), 541-4.
311. Luo M, Fernandez-Estivariz C, Jones DP, Accardi CR, Alteheld B, Bazargan N et al. Depletion of plasma antioxidants in surgical intensive care unit patients requiring parenteral feeding: effects of parenteral nutrition with or without alanyl-glutamine dipeptide supplementation. *Nutrition*, 2008, 24, 37-44.
312. Jackson NC, Carroll PV, Russell-Jones DL, Sonksen PH, Treacher DF, Umpleby AM. The metabolic consequences of critical illness: acute effects on glutamine and protein metabolism. *Am J Physiol* 1999, 276, E163-170.
313. Jones NE, Heyland DK. Pharmacconutrition: a new emerging paradigm. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24, 215-222.
314. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*, 2001, 27, 84-90.
315. Rodas PC, Rooyackers O, Hebert C, Norberg A, Wernerman J. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. *Clin Sci*, 2012, 122, 591-597.
316. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, Cook D, Jones G, Albert M, et al. Canadian Critical Care Trials G: A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N Engl J Med*, 2013, 368, 1489-1497.
317. Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Van Aken H, Stehle P et al. Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*, 2002, 30, 2032-2037.
318. Griffiths RD, Allen KD, Jones C. Glutamine TPN and intensive care acquired infections. *Clin Nutr* 2000, 19(1), 42.
319. Wischmeyer EP, Dhaliwal R, McCall M, Ziegler RT, Heyland KD. Parenteral glutamine supplementation in critical illness: a systematic review. *Critical Care*, 2014, 18, R76.
320. Taylor B, Krenitsky J. Nutrition in the intensive care unit: year in review 2008-2009. *J Parenter Enteral Nutr*, 2010, 34, 21-31.
321. Reddell L, Cotton A.B. Antioxidants and micronutrient supplementation in trauma patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15, 181-187.
322. Weitzel LR, Wischmeyer PE. Glutamine in critical illness: the time has come, the time is now. *Crit Care Clin*, 2010, 26, 515-525.
323. Dechelotte P, Hasselmann M, Cynober L, et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: The French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med*, 2006, 34, 598-604.

324. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Droger JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med*, 2002, 30, 2022–9.
325. Singer P, Berger M.M, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Intensive care. *Clinical Nutrition*, 2009, 28, 387–400.
326. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 16, 705–743.
327. Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm Metab Res*, 2009, 41, 443–447.
328. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 2000, 356, 233–241.
329. Manzanares W, Hardy G. Selenium supplementation in the critically ill: posology and pharmacokinetics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2009, 12, 273–280.
330. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients *Crit Care Med*, 1998, 26(9), 1536–44.
331. Stoppe C, Schälte G, Rossaint R, Coburn M, Graf B, Spillner J et al. The intraoperative decrease of selenium is associated with the postoperative development of multiorgan dysfunction in cardiac surgical patients. *Crit Care Med*, 2011, 39, 1879–1885.
332. Forceville X, Laviolle B, Annane D, Bleichner G, Korach JM, Cantais E et al. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Crit Care*, 2007, 11, R73.
333. Manzanares W, Biestro A, Torre MH, Galusso F, Facchin G, Hardy G et al. High-dose selenium reduces ventilator-associated pneumonia and illness severity in critically ill patients with systemic inflammation. *Intensive Care Med* 2011, 37, 1120–1127.
334. Valenta J, Brodska H, Drabek T, Hendl J, Kazda A. High-dose selenium substitution in sepsis: a prospective randomized clinical trial. *Intensive Care Med* 2011, 37, 808–815.
335. Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P et al. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* 2007, 35, 118–126.
336. Forceville X. Seleno-enzymes and seleno-compounds: the two faces of selenium *Crit Care*, 2006, 10(6), 180.
337. Sodium Selenite and Procalcitonin Guided Antimicrobial Therapy in Severe Sepsis (SISPCT), 2013, [ClinicalTrials.gov: NCT00832039](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00832039).
338. Reddell L, Cotton A.B. Antioxidants and micronutrient supplementation in trauma patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15, 181–187.
339. Cander B, Dundar ZD, Gul M, Girisgin S. Prognostic value of serum zinc levels in critically ill patients. *J Crit Care*, 2010, 26, 42–46.
340. Heyland DK, Jones N, Cvijanovich NZ, Wong H. Zinc supplementation in critically ill patients: a key pharmaconutrient? *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2008, 32(5), 509–19.

341. Vanek VW, Borum P, Buchman A, Fessler TA, Howard L, Jeejeebhoy K, et al. A. S. P. E. N. position paper: recommendations for changes in commercially available parenteral multivitamin and multitrace element products. *Nutr Clin Pract*, 2012, 27, 440–491.
342. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*, 2007, 151, 580–590.
343. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 2008, 582, 1783–1787.
344. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18, 321–336.
345. Halliwell B. Albumin—an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*, 1988, 37, 569–571.
346. Sung J, Bochicchio GV, Joshi M, Bochicchio K, Costas A, Tracy K et al. Admission serum albumin is predictive of outcome in critically ill trauma patients. *Am Surg* 2004, 70, 1099–1102.
347. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R. SAFE Study Investigators. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med*, 2004, 350, 2247–2256.
348. Dubois MJ, Orellana-Jimenez C, Melot C, De Backer D, Berre J, Leeman M, et al. Albumin administration improves organ function in critically ill hypoalbuminemic patients: a prospective, randomized, controlled, pilot study. *Crit Care Med*, 2006, 34, 2536–2540.
349. Finfer S, McEvoy S, Bellomo R, McArthur C, Myburgh J, Norton R, SAFE Study Investigators. Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 2011, 37, 86–96.
350. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011,(3), CD000567.
351. Tollefson BJ, Jones AE. Does resuscitation with albumin-containing solutions improve mortality in sepsis? *Ann Emerg Med* 2012, 59, 432–433.
352. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, 2011, 39, 386–391.
353. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 1989, 6, 593–7.
354. Witschi A, Reddy S, Stofer B, et al. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992, 43, 67–9.
355. Dodd S, Dean O, Copolov DL, et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8, 1955–62.
356. Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI, Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med*, 1992, 20, 918–923.
357. Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, Ritz R, Perret C. Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *J Crit Care*, 1997, 12, 177–182.

358. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA et al. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest*, 1997, 112, 164–172.
359. Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R, Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest*, 1994, 105, 190–194.
360. Kiefer P, Vogt J, Radermacher P. From mucolytic to antioxidant and liver protection: new aspects in the intensive care unit career of N-acetylcysteine. *Crit Care Med*, 2000, 28, 3935–3936.
361. Ortolani O, Conti A, Gaudio DeAR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161, 1907–1911.
362. Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A, Welte M, Meier-Hellmann A et al. N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med*, 2000, 28, 3799–3807.
363. Hein OV, Ohring R, Schilling A, Oellerich M, Armstrong VW, Kox WJ et al. N-acetylcysteine decreases lactate signal intensities in liver tissue and improves liver function in septic shock patients, as shown by magnetic resonance spectroscopy: extended case report. *Crit Care*, 2004, 8, R66–R71.
364. Molnar Z, MacKinnon KL, Shearer E, Lowe D, Watson ID. The effect of N-acetylcysteine on total serum anti-oxidant potential and urinary albumin excretion in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 1998, 24, 230–235.
365. Vassilev D, Hauser B, Bracht H, Ivanyi Z, Schoaff M, Asfar P et al. Systemic, pulmonary, and hepatosplanchnic effects of N-acetylcysteine during long-term porcine endotoxemia. *Crit Care Med*, 2004, 32, 525–532.
366. Szakmany T, Hauser B, Radermacher P. N-acetylcysteine for sepsis and systemic inflammatory response in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 12, 9, CD006616.
367. Halliwell B, Gutteridge JMC. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 280(1), 1–8.
368. Wilson JX. Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr*, 2005, 25, 105–1.
369. Biesalski KH, McGregor GP. Antioxidant therapy in critical care—Is the microcirculation the primary target? *Crit Care Med*, 2007, 35, 9 (Suppl.)
370. Wilson JX, Wu F. Vitamin C in Sepsis. *O. Subcell Biochem*, 2012, 56, 67–83.
371. Long CL, Maull KI, Krishnan RS, Laws HL, Geiger JW, Borghesi L et al. Ascorbic acid dynamics in the seriously ill and injured. *J Surg Res*, 2003, 109, 144–148.
372. Crimi E, Liguori A, Condorelli M, Cioffi M, Astuto M, Bontempo P et al. Beneficial effects of antioxidant supplementation in enteral feeding in critically ill patients: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anesth Analg*, 2004, 99, 857–863.
373. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, Klotz P, Farver K, Ruzinski JT et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, 2002, 236, 814–822.
374. Kahn SA, Beers RJ, Lentz CW. Resuscitation after severe burn injury using high-dose ascorbic acid: a retrospective review. *J Burn Care Res*, 2010, 32, 110–117.



375. Tanaka H, Matsuda T, Miyagantani Y, Yukioka T, Matsuda H, Shimazaki S.Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration: a randomized, prospective study. *Arch Surg*, 2000, 135, 326–331.
376. Bailey DM, Raman S, McEneny J, Young IS, Parham KL, Hullin DA et al.Vitamin C prophylaxis promotes oxidative lipid damage during surgical ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40, 591–600.
377. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A et al.Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med*, 2004, 140(7), 533–537.
378. Fowler AA, Syed AA, Knowlson S, Sculthorpe R, Farthing D, DeWilde C et al. Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis. *J Trans Med*, 2014, 12, 32.
379. Jiang Q.Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 72, 76–90.
380. Burton GW, Joyce A, Ingold KU.Is vitamin E the only lipidsoluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys*, 1983, 221, 281–90.
381. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F.The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2014, 14(2), 157-65.
382. N. Takeda K, Shimada Y, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I.Plasma lipid peroxides and alpha-tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med*, 1984, 12(11), 957-9.
383. Preiser JC, Gossum AV, Berré J, Vincent JL, Carpentier Y.Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamins A, C and E enhances the resistance to oxidative stress. *Crit Care Med* 2000, 28, 3828-3832.
384. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: The Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, 2008, 300, 2123–33.
385. Moya-Camarena SY, Jiang Q.The role of vitamin E forms in cancer prevention and therapy—studies in human intervention trials and animal models. *Nutraceuticals and Cancer*. NewYork: Springer;2012.p.323–354.
386. Myung SK, Ju W, Cho B, Oh SW, Park SM, Koo BK et al. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ*, 2013, 346, f10.
387. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE.B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin Sci (Lond)*, 2004, 107(5), 477–484.
388. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE.Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *J Parenter Enter Nutr*, 2006, 30, 108–114.
389. Cruickshank AM, Telfer ABM, Shenkin A.Thiamine deficiency in the critically ill. *Intensive Care Med*, 1988, 14, 384-387.
390. Manzanares W, Hardy G.Vitamin B12: the forgotten micronutrient for critical care. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13, 662–668.

391. Ogilvie AC, Groeneveld AB, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med*, 1991, 17, 40–44.
392. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med*, 1996, 24, 1649–1653.
393. Strand OA, Leone A, Giercksky KE, Kirkeboen KA. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med*, 2000, 28, 2779–2785.
394. Chuang C, Shiesh S, Chi C, Tu Y, Hor L, Shie C, Chen M. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Critical Care*, 2006, 10, R36.
395. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon D. K. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit. Care Med*, 1996, 24, 1179–1183.
396. Ohya M, Marukawa S, Inoue T, Ueno N, Hosohara K, Terada N et al. Plasma nitrotyrosine concentration relates to prognosis in human septic shock. *Shock*, 2002, 18, 116–118.
397. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*, 1996, 24, 392–397.
398. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D et al. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med*, 1998, 26, 705–709.
399. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobe P, Dougnac A et al. 2008. Lipoperoxidation and Protein Oxidative Damage Exhibit Different Kinetics During Septic Shock. *Mediators of Inflammation* 2008:168652.
400. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic Role of Antioxidant Enzymes in Sepsis: Preliminary Assessment. *Clinical Chemistry*, 1995, 41, 867–71.
401. Nikolaidis M, Jamurtas A. Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 490, 77–84.
402. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7, 161–68.
403. Lemineur T, Deby-Dupon G, Preiser J. Biomarkers of oxidative stress in critically ill patients: what should be measured, when and how? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9, 704–10.
404. Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein A, Knaus W et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992, 101, 1644–1655.
405. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 1985, 13(10), 818–29.
406. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 1998, 26(11), 1793–800.

407. Kreymann KG, Berger MM, Deutz NEP, Hiesmayr M, Jolliet P, Kazandjiev G, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care. *Clinical Nutrition*, 2006, 25, 210–223.
408. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Intensive care. *Clinical Nutrition*, 2009, 28, 387–400.
409. Keles M, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 2001, 28, 141–143.
410. Στάγκος Δ, Κουρέτας Δ. Εργαστηριακές σημειώσεις βιοχημικής τοξικολογίας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2014.
411. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*, 2004, 357, 83–86.
412. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood TAC plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, 2002, 62, 231–236.
413. Reddy Y, Murthy S, Krishna D, Prabhakar M. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc*, 2004, 51, 213–218.
414. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984, 105, 121–126.
415. Biolo G, Antonione R, De Cicco M. Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med*, 2007, 35 (9 Suppl).
416. Çimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 2008, 390, 1–11.
417. Richards RS, Roberts TK, Dunstan RH, MGregor NR, Butt HL. Erythrocyte antioxidant systems protect cultured endothelial cells against oxidant damage. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 46, 857–865.
418. Fläring UB, Rooyackers OB, Wernerman J, Hammarqvist F. Temporal changes in muscle glutathione in ICU patients. *Intens Care Med*, 2003, 29, 2193–2198.
419. Fläring UB, Rooyackers OE, Hebert C, Bratel T, Hammarqvist F, Wernerman J. Temporal changes in whole-blood and plasma glutathione in ICU patients with multiple organ failure. *Intensive Care Med*, 2005, 31, 1072–1078.
420. Malmezat T, Breuille D, Capitan P, Mirand P, Obled C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr*, 2000, 130, 1239–1246.
421. Brealey D, Karyampud S, Jacques ST, Novelli M, Stidwill R, Taylor V et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 286, 491–497.
422. Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL. Effects of low protein diets or feed restriction on rat lung glutathione and oxygen toxicity. *J Nutr*, 1985, 115, 726–732.
423. Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu XM, Zurakowski D, Curley M et al. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med*, 2001, 29, 870–877.

424. Rifkind JM, Ajmani RS, Heim J. Impaired hemorheology in the aged associated with oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 428, 7–13.
425. Aoshiba K, Nakajima Y, Yasui S, Tamaoki J, Nagai A. Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*, 1999, 93, 4006–4010.
426. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, 2007, 19(9), 1807-19.
427. Van der Crabben SN, Stegengab ME, Blümera RME, Ackermansc MT, Endertc E, Tanckd MWT et al. Erythrocyte glutathione concentration and production during hyperinsulinemia, hyperglycemia, and endotoxemia in healthy humans. *Metabolism*. 2011, 60(1), 99-106.
428. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*, 2007, 113, 234-58.
429. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis, *Mol Aspects Med*, 2009, 30, 42–59.
430. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27, 922–935.
431. Guerreiro MO, Petronilho F, Andrades M, Constantino L, Mina F, Moreira JC et al. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in septic patients. *J Trauma*, 2010, 69, 102–106.
432. Leff JA, Parsons PE, Day CE, Moore EE, Moore FA, Oppegard MA, Repine JE. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis*, 1992, 146, 985–989.
433. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*, 1991, 37(11), 1932-7.
434. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(21), 10405-9.
435. Foresman EL, Miller FJr. Extracellular but not cytosolic superoxide dismutase protects against oxidant-mediated endothelial dysfunction *Redox Biology*, 2013, 1, 292–296.
436. Pawlak KT, Pawlak TD, Mysliwiec M. Cu/Zn superoxide dismutase plasma levels as a new useful clinical biomarker of oxidative stress in patients with end-stage renal disease. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38, 700–705.
437. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, Constantino L, Machado R, Ritter C et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med*, 2009, 10(4), 467-71.
438. Luchtemberg MN, Petronilho F, Constantino L, Gelain DP, Andrades M, Ritter C et al. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin Biochem*, 2008, 41(14-15), 1186-90.
439. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med*, 2000, 29, 1106-1114.
440. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D et al. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med*, 1998, 26, 705–709.
441. Doise JM, Aho LS, Quenot JP, Guillaud JC, Zeller M, Vergely C. Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22, 203–209.

442. Grune T, Berger MM. Markers of oxidative stress in ICU clinical settings: present and future. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007, 10, 712–717.
443. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free Radical Res*, 2010, 44, 711–720.
444. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*, 2007, 380, 50–58.
445. Ware LB, Fessel JP, May AK, Roberts II LJ. Plasma Biomarkers of Oxidant Stress and Development of Organ Failure in Severe Sepsis. *Shock*, 2011, 36(1), 12–17.

## V. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Κατάλογος Πινάκων

**Πίνακας 1.** Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) στον άνθρωπο. σελ. 19.

**Πίνακας 2.** Ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά. σελ. 33.

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 $\mu$ L	495 $\mu$ L	480 $\mu$ L
DPPH 0.1 mM	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 $\mu$ L	-
Πλάσμα	-	-	20 $\mu$ L

**Πίνακας 3.** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 $\mu$ L	660 $\mu$ L
DTNB 1 mM	330 $\mu$ L	330 $\mu$ L
Απεσταγμένο νερό	20 $\mu$ L	-
Αιμόλυμα	-	20 $\mu$ L

**Πίνακας 4.** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.

	Κενό	Πρότυπο (0.75 nmol/mL)	Δείγμα
Phosphate buffer	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L
NADPH	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
DTNB	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Απεσταγμένο νερό	199 $\mu$ L	124 $\mu$ L	194 $\mu$ L
GSSG	—	75 $\mu$ L	—
Αιμόλυμα	—	—	5 $\mu$ L

**Πίνακας 5.** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSSG.

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 $\mu$ L
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 $\mu$ L

**Πίνακας 6.** Ποσότητες διαλυμάτων για την μέτρηση της καταλάσης

**Πίνακας 7.** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. σελ. 99.

**Πίνακας 8.** Μέση τιμή όλων των βιοδεικτών στις δύο ομάδες κατά την διάγνωση της σήψης. σελ. 101.

## Κατάλογος Γραφημάτων

**Γράφημα 1.α.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών της καταλάσης στις δύο ομάδες στο χρονικό σημείο **1.β.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών της καταλάσης στην υποομάδα όσων κατέληξαν εξαιτίας της καταπληξίας και των επιζώντων στο χρονικό σημείο 1. σελ 102. **1.γ.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών των καρβονυλίων στις δύο ομάδες στο χρονικό σημείο 1. **1.δ.** Απεικόνιση των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων των τιμών των καρβονυλίων στην υποομάδα όσων κατέληξαν εξαιτίας της καταπληξίας και των επιζώντων στο χρονικό σημείο 1. σελ. 103.

**Γράφημα 2.α.** Καμπύλη ROC που αναδεικνύει την ακρίβεια μέτρησης της καταλάσης στο χρονικό σημείο 1 για την ανίχνευση όσων θα καταλήξουν εξαιτίας της καταπληξίας. **2.β.** Καμπύλη ROC που αναδεικνύει την ακρίβεια μέτρησης των καρβονυλίων στο χρονικό σημείο 1 για την ανίχνευση όσων θα καταλήξουν εξαιτίας της καταπληξίας. σελ 104.

**Γράφημα 3.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών της ανηγμένης γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. σελ. 105.

**Γράφημα 4.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. σελ 106.

**Γράφημα 5.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών της σουπεροξειδικής δισμουτάσης στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων σε όλα τα χρονικά σημεία μέτρησης. σελ.106.

**Γράφημα 6.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών των καρβονυλίων του πλάσματος σε επιβιώσαντες-αποβιώσαντες στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. σελ 107.

**Γράφημα 7.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών του λόγου GSH/GSSG στα ερυθροκύτταρα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων σε όλα τα χρονικά σημεία μέτρησης.



σελ.108.

**Γράφημα 8.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών των TBARS στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης.

σελ.108.

**Γράφημα 9.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών του 8-ισοπροστανίου στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης.

σελ.109.

**Γράφημα 10.** Απεικόνιση μέσων όρων των τιμών της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα επιβιωσάντων-αποβιωσάντων στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέτρησης. σελ. 109.

## **Κατάλογος Αντιδράσεων**

- Αντίδραση 1.1.** Αντίδραση Fenton σελ. 21
- Αντίδραση 1.2.** Αντίδραση Haber-Weiss σελ. 22
- Αντίδραση 1.3.** Οξείδωση του NADPH σελ. 22
- Αντίδραση 1.4.** Αντίδραση μονοοξυγενάσης σελ. 24
- Αντίδραση 1.5.** Αντίδραση σχηματισμού θειολικών ριζών σελ. 30
- Αντιδράσεις 1.6-1.9.** Σχηματισμός οξειδωμένων λιπιδιακών παραγώγων σελ.31
- Αντίδραση 1.10.** Οξείδωση ανηγμένης γλουταθειόνης σελ. 38
- Αντίδραση 1.11.** Αναγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης σελ. 39
- Αντίδραση 2.1.** Σχηματισμός NO σελ. 55
- Αντίδραση 2.2** Οξείδωση ξανθίνης σελ. 56
- Αντίδραση 2.3.** Οξείδωση υποξανθίνης σελ. 56
- Αντιδράσεις 2.4 & 2.5.** Αναγωγή σουπεροξειδίου σελ. 57
- Αντίδραση 2.6.** Αντίδραση καταλάσης σελ. 57
- Αντίδραση 2.7.** Αντίδραση περοξυρεδοξίνης σελ. 59
- Αντίδραση 2.8.** Αντίδραση θειορεδοξίνης σελ. 59